

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Fisiología



TESIS DOCTORAL

**Estudio del receptor de serotonina 5-HT_{1A} en la epileptogénesis
mediante micropept**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Pablo Bascuñana Almarcha

Director
Miguel Ángel Pozo García

Madrid, 2014

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Fisiología



**ESTUDIO DEL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT_{1A}
EN LA EPILEPTOGÉNESIS MEDIANTE MICROPET**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Pablo Bascuñana Almarcha

Director: Miguel Ángel Pozo García

A mi familia,
los que están y
los que nos dejaron

A Miguel Ángel Pozo, por darme la oportunidad de iniciarme en la investigación científica y haber sido mi mentor durante todos estos años no solo en la epilepsia y el PET. Por proporcionarme toda la formación e introducirme en el mundo de la investigación.

Igualmente agradezco a mis compañeros del “Pluri” toda su ayuda y formación. A Mercedes Delgado, por enseñarme todo lo que he aprendido sobre el PET y a Luis García, por estar siempre dispuesto a aclarar mis dudas con su inusual memoria. Por supuesto, a Rubén F. De la Rosa, por ser mucho más que un compañero, por ser mi apoyo en el laboratorio y fuera de él, y, por supuesto, por las numerosas fotos e imágenes, algunas de las cuales ilustran esta tesis. A Julián Javela, por enseñarme y aprender juntos todo lo que sé de epilepsia y por hacer más llevaderos los momentos menos apasionantes de los experimentos con tus sorprendentes historias. A Ahmed Shiha, porque, a pesar de llegar el último, también has sido importante en este trabajo. También quiero mostrar mi agradecimiento a Ana, Sonia, Héctor y toda la gente que ha pasado por Cartografía, por colaborar en mayor o menor medida en este trabajo.

A mis padres, por apoyarme y confiar en mí siempre, aún cuando no compartían mis decisiones. Por transmitirme su orgullo y amor y por todos los esfuerzos hechos para darme la oportunidad de hacer lo que más me gusta. A mis hermanos Chema y María, por ser mis referentes en la vida y por cuidarme y protegerme desde el día que nací. A mis padrinos, por aconsejarme y estar siempre pendientes de que podían hacer para que yo pudiera realizar esta tesis y a mis primos Toño y Maite y mis “sobris” Ángela y Lucía.

A todos mis amigos torrevejenses: Cayu, Juanma, Hugo, Javi, Isa, Humber... y a los oriolanos: Elvira y Pepe, porque de una forma indirecta habéis puesto vuestro granito de arena en este trabajo.

A mis compañeros de carrera, Malva, Ángela, Miriam, Marta ...y, en especial, a Roberto y Mónica, por hacer de la universidad la mejor época de mi vida y contribuir a mi pasión por la ciencia y la vida de laboratorio.

Finalmente, mi agradecimiento al Instituto Tecnológico PET, porque gracias a la beca Alfonso Casanova he podido realizar esta tesis doctoral, y a James Kelly, por todas las veces que ha tenido que radiarse para que pudiera hacer mis experimentos con MPPF.

Abreviaturas y acrónimos

5-HT: 5-hidroxitriptamina

8-OH-DPAT: (±)-8-Hidroxi-2-dipropilaminotetralin hidrobromida

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMPA: ácido α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropiónico

AP: anteroposterior

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BDNF: factor neurotrófico derivado cerebral

BSA: albúmina sérica bovina

CT: tomografía axial computerizada

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DV: dorsoventral

ECG: electrocardiograma

FDG: fluorodesoxiglucosa

FMZ: flumazenilo

FOV: campo de visión

GABA: ácido gamma-aminobutírico

GFAP: proteína ácida fibrilar glial

ILAE: Liga Internacional Contra la Epilepsia

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intravenoso

KA: ácido kaínico

KeV: kiloelectronvoltio

LOR: línea de respuesta

MAM: metilazoximetanol-acetato

ML: mediolateral

MPPF: 2'-methoxyphenyl-(N-2'-pyridinyl)-p-fluoro-benzamidoethyipiperazine

MRI: imagen de resonancia magnética

NGF: factor de crecimiento neuronal

NMDA: N-metil-D-aspartato

OSEM: ordered subset expectation maximization

PET: tomografía por emisión de positrones

PTZ: pentilentetrazol

RMN: resonancia magnética nuclear

SE: *status epilepticus*

SNC: sistema nervioso central

SRTM: modelo simplificado de tejido de referencia

TAC: curva actividad-tiempo

TLE: epilepsia del lóbulo temporal

UV: ultravioleta

VOI: volumen de interés

WAY100635: [N-[2-[4-(2-Metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-N-2-piridinilciclohexanocarboxamida]

0. Resumen 6

1. Introducción 22

1.1 Epilepsia	23
1.2 Epileptogénesis	24
1.2.1 Neurotransmisores.....	25
Glutamato	25
GABA.....	26
Serotonina	27
1.2.2 Cambios genéticos	30
1.2.3 Cambios celulares inducidos por una crisis	32
1.2.4 Mecanismo prion-like.....	34
1.3 Epilepsia del lóbulo temporal	34
1.4 Modelos animales de epilepsia.....	36
1.4.1 Modelos genéticos.....	37
1.4.2 Modelos adquiridos.....	39
1.5 La tomografía por emisión de positrones en la epilepsia.....	53
1.5.1 Características técnicas de la tomografía por emisión de positrones	53
1.5.2 Radiotrazadores	57
1.5.3 PET y epilepsia	60

2. Objetivos..... 65

3. Materiales y métodos 68

3.1 Animales experimentales	70
3.1.1 Manejo.....	70
3.2 Cirugía e implantación de electrodos	71
3.2.1 Protocolo de PTZ agudo	72
3.2.2 Protocolo de kindling eléctrico	72
3.3 Registros electrofisiológicos.....	74
3.3.1 Protocolo de PTZ agudo	74
3.3.2 Protocolo de kindling eléctrico	74
3.4 Modelos experimentales	75
3.4.1 Modelo de PTZ agudo	75
3.4.2 Modelos de Kindling	76
3.5 Tratamiento con 8-OH-DPAT	79
3.6 Grupos experimentales.....	80
3.6.1 Protocolo de PTZ agudo	80

3.6.2	Protocolos de kindling	80
3.7	Evaluación comportamental de las crisis	82
3.7.1	Protocolo de PTZ agudo	82
3.7.2	Protocolos de kindling	83
3.8	Estudios de imagen in vivo	84
3.8.1	Estudios PET con 18F-FDG	85
3.8.2	Estudios PET con 18F-MPPF	88
3.8.3	Imágenes Resonancia Magnética.....	90
3.9	Estudios autorradiográficos	91
3.9.1	Autorradiografía ex vivo de 18F-FDG	91
3.9.2	Autorradiografía in vitro de 18F-MPPF.....	93
3.9.3	Autorradiografías con ligandos tritiados.....	94
3.9.4	Estudios de marcaje con fluoróforos.....	98
3.10	Reactivos empleados.....	100
3.10.1	Estudios in vitro	100
3.10.2	Fármacos	101

4. Resultados.....102

4.1	Modelo de PTZ agudo	103
4.1.1	Electrofisiología	103
4.1.2	Estudios PET	106
4.2	Modelo de kindling químico	112
4.2.1	Evolución peso	113
4.2.2	Estudios de imagen PET	114
4.2.3	Estudios autorradiográficos con flúor-18	120
4.2.4	Autorradiografías de ligandos tritiados	122
4.2.5	Estudios de marcaje con fluoróforos	125
4.3	Modelo de kindling eléctrico	127
4.3.1	Evaluación comportamental	128
4.3.2	Electrofisiología	129
4.3.3	Estudios de imagen PET	131
4.3.4	Estudios autorradiográficos con flúor-18	136
4.3.5	Autorradiografía de ligandos tritiados	138
4.3.6	Estudios de marcaje con fluoróforos	142
4.4	Comparativa entre modelos	144
4.4.1	Epileptogénesis	144
4.4.2	Tratamiento con 8-OH-DPAT	144
4.4.3	Estudios de imagen PET	144
4.4.4	Estudios histoquímicos.....	146

5. Discusión147

5.1 Modelo de PTZ agudo	148
5.1.1 Evaluación del modelo	148
5.1.2 Tratamiento con 8-OH-DPAT	148
5.1.3 Estudios de imagen	149
5.2 Modelo de kindling con PTZ	153
5.2.1 Evaluación del modelo	153
5.2.2 Tratamiento con 8-OH-DPAT	154
5.2.3 Estudios de imagen con microPET	155
5.2.4 Estudios autorradiográficos con ligandos tritiados	157
5.2.5 Estudios de histoquímica	157
5.3 Modelo de kindling eléctrico	158
5.3.1 Evaluación del modelo	158
5.3.2 Tratamiento con 8-OH-DPAT	159
5.3.3 Estudios de imagen con flúor-18	160
5.3.4 Estudios autorradiográficos con ligandos tritiados	161
5.3.5 Estudios de histoquímica	162
5.4 Comparativa entre los modelos de epileptogénesis	164
5.4.1 Evaluación de los modelos	164
5.4.2 Estudios de imagen con microPET	164
5.4.3 Efecto de la serotonina a través del receptor 5-HT _{1A} en la epileptogénesis	169

6. Conclusiones173

7. Bibliografía176

0. Resumen

Introducción

La epilepsia es una enfermedad neurológica crónica que se caracteriza por ataques recurrentes que son la manifestación física de descargas neuronales excesivas, sincronizadas, súbitas y generalmente autolimitadas. Es una enfermedad frecuente que integra más de 40 síndromes clínicos y afecta a un 0,5-2% de la población mundial. Su etiología es diversa y en muchos casos desconocida. Más del 30 % de los pacientes no es capaz de controlar las crisis a pesar de recibir un tratamiento farmacológico adecuado, es decir, son epilepsias refractarias al tratamiento médico o farmacorresistentes. De entre todos los tipos de epilepsia, la epilepsia del lóbulo temporal es la más frecuente y la que mayor tasa de resistencia al tratamiento farmacológico presenta (Morimoto et al., 2004; Theodore y Fisher, 2004; Goffin et al., 2008; Akhlaghi et al., 2012).

Los mecanismos básicos celulares y moleculares de la epileptogénesis están sujetos a investigación. Se han descrito diferentes alteraciones en los sistemas de neurotransmisión y en la reorganización de circuitos neurales que pudieran estar implicados en la epileptogénesis. La serotonina tiene un amplio rango de funciones en el SNC. Además de su papel fisiológico, se ha visto que la serotonina está implicada en diversas patologías neurológicas como la enfermedad de Alzheimer, la depresión, la esquizofrenia o la epilepsia (Aznavour y Zimmer, 2007; Xi et al., 2011). Hay evidencias que indican que la neurotransmisión serotoninérgica modula las crisis en varios modelos experimentales de epilepsia. Los mecanismos que aumentan los niveles extracelulares de serotonina inhiben las crisis, mientras que la depleción de este neurotransmisor disminuye el umbral de las crisis y aumenta su duración (Merlet et al., 2004; Bagdy et al., 2007).

Hay varios modelos animales de epilepsia que pueden utilizarse para el estudio de la epileptogénesis. Entre ellos destaca el modelo de kindling y los modelos de *status epilepticus*. El kindling es el modelo animal de epilepsia del lóbulo temporal más utilizado. El modelo de kindling se basa en el desarrollo

progresivo de crisis en respuesta a la aplicación repetida e intermitente de un estímulo eléctrico o químico subconvulsivo. Una vez aparecen las crisis epilépticas generalizadas, las alteraciones se mantienen durante meses o años. Los modelos de *status epilepticus* inducidos por la administración de ácido kaínico o pilocarpina se caracterizan por provocar crisis espontáneas y se acompañan de una alta tasa de mortalidad (Morimoto et al., 2004; Bertram et al., 2007).

Alguno de estos modelos ha sido estudiado mediante imagen funcional PET, demostrándose alteraciones metabólicas cerebrales y cambios en los sistemas de neurotransmisión. En el modelo de inyección de ácido kaínico provoca una zona hipermetabólica (Sawamura et al., 2001) mientras que en el modelo de pilocarpina se observa un hipometabolismo cerebral generalizado (Goffin et al., 2009; Guo et al., 2009). En los estudios con PET-FDG de pacientes con epilepsia focal se ha descrito una zona de hipometabolismo cortical que corresponde con la zona epileptógena (O'Brien et al., 2008; Duncan, 2009). También se han utilizado otros radiotrazadores diferentes, como el 18F-MPPF y el 11C-Flumazenilo, con los que también se ha detectado la zona epileptógena en estos pacientes (Theodore et al., 2012).

Objetivos

Esta tesis pretende analizar el papel de la vía serotoninérgica a través del receptor 5-HT_{1A} en la epileptogénesis con un doble objetivo general. Primero, investigar si el 18F-MPPF, un radiotrazador PET antagonista del receptor de serotonina 5-HT_{1A}, es un biomarcador del proceso de epileptogénesis *in vivo* con posible aplicabilidad en la localización de la zona epileptógena en la planificación de la cirugía de la epilepsia y, segundo, la posible identificación de una nueva diana terapéutica para el control y tratamiento de esta enfermedad. Para ello se explorará, mediante técnicas de imagen funcional (microPET), la densidad del receptor 5-HT_{1A} y la actividad metabólica en diferentes modelos experimentales de epilepsia del lóbulo temporal.

Para ello se han desarrollado dos modelos diferentes: un modelo de crisis epilépticas agudas con PTZ, y el modelo de kindling con dos protocolos diferentes: kindling eléctrico y kindling químico con PTZ.

Resultados

En el modelo de crisis epilépticas por administración aguda de PTZ se observó un hipermetabolismo en las neuronas del estriado en el momento de la crisis en los estudios dinámicos de adquisición de imagen PET. Sin embargo, después de unos minutos, el cerebro de estos animales muestra un hipometabolismo generalizado. Los estudios PET con 18F-MPPF mostraron un aumento del *binding* de este radiotrazador en los animales tras la crisis epiléptica provocada por el PTZ.

El tratamiento con 8-OH-DPAT redujo de forma notable el número de crisis que sufrían los animales en un 80%, la duración de éstas en casi un 50% y el nivel comportamental alcanzado durante las crisis.

En el modelo de kindling, tanto químico como eléctrico, se realizaron estudios PET con ambos radiotrazadores al inicio, durante la segunda semana y al final del protocolo. Además, como en el modelo de PTZ agudo, se testó el efecto antiepileptogénico del 8-OH-DPAT en ambos protocolos de kindling.

El modelo de kindling químico fue efectivo en el 66% de los animales sometidos al protocolo. La tasa de mortalidad fue de un 16% debido a la aparición de *status epilepticus*. Una vez finalizados los experimentos se subdividió al grupo de kindling en positivos y negativos, según si habían alcanzado el nivel 5 en 3 sesiones consecutivas. Tras esta subdivisión, los animales kindling positivo presentaban un hipometabolismo cortical e hipermetabolismo en la protuberancia respecto de los animales kindling negativo y el grupo control.

En los estudios de imagen con 18F-MPPF, los animales kindling químico positivo presentaban un aumento del *binding potential* de este trazador. Sin embargo, este aumento del *binding potential* no se observó en los estudios de autorradiografía *in vitro* con este mismo radiotrazador.

En los estudios *in vitro* con ligandos tritiados se halló un aumento de receptores de glutamato tipo AMPA y NMDA en los animales de kindling. Los receptores de kainato, de benzodiazepinas y el recaptador de serotonina no mostraron diferencias respecto al grupo control. En los estudios de inmunohistoquímica no se observó marcaje de neurodegeneración ni de activación glial.

El tratamiento con 8-OH-DPAT redujo el número de animales que alcanzaban el kindling. Sin embargo, la mortalidad debida a este protocolo no se vio modificada por el tratamiento con el agonista de 5-HT_{1A}.

En los estudios PET con 18F-FDG en el modelo de kindling eléctrico se observó un hipermetabolismo en corteza entorrinal y núcleos estriados comparando con el grupo control. Estos resultados se corresponden con lo observado en la autorradiografía *ex vivo* realizada al finalizar el protocolo.

El estudio del receptor 5-HT_{1A} con 18F-MPPF en este modelo demostró un aumento del *binding potential* de este trazador en los animales de kindling eléctrico en la corteza entorrinal contralateral y el septum. Sin embargo, este aumento no se observó en los estudios *in vitro* realizados con este trazador.

En los estudios *in vitro* con ligandos tritiados, los animales que desarrollaron kindling eléctrico presentaban un descenso de la población de receptores de glutamato tipo AMPA y NMDA y de los receptores de benzodiazepinas. Los receptores de glutamato tipo kainato y el recaptador de serotonina no mostraron diferencias respecto al grupo control. En los estudios de inmunohistoquímica no se observó marcaje de neurodegeneración, pero sí la presencia de gliosis reactiva en las paredes de los ventrículos.

El tratamiento con 8-OH-DPAT previo a la estimulación no tuvo efecto en el progreso del kindling eléctrico.

Discusión

El estudio de imagen metabólica del modelo de PTZ agudo refleja un patrón temporal de actividad neuronal similar al observado en los registros electrofisiológicos. Se observa un aumento de la actividad metabólica durante la fase ictal de descarga neuronal de alta frecuencia y, posteriormente, una depresión postictal durante la cual la actividad eléctrica está muy por debajo de la actividad basal y la imagen PET refleja un hipometabolismo cerebral generalizado.

En los animales pretratados con 8-OH-DPAT, el porcentaje de éstos que alcanzaba la crisis convulsiva disminuyó hasta el 75%. Además, el pretratamiento con el agonista de 5-HT_{1A} redujo la duración e intensidad de las crisis. Estos resultados sugieren que el efecto preventivo del 8-OH-DPAT podría ser debido a su acción sobre los receptores postsinápticos 5-HT_{1A} de las neuronas piramidales hipocámpales, produciendo una respuesta inhibitoria debida a la hiperpolarización de la membrana producida por la apertura de canales de potasio.

Los animales sometidos a kindling químico con PTZ se pudieron diferenciar en dos subgrupos, dependiendo de si alcanzaban el estado de kindling o no (kindling positivo y kindling negativo). Los animales kindling positivo presentaban una menor actividad metabólica cerebral que los animales kindling negativo. Este hipometabolismo ya era visible tras las 5 primeras inyecciones de PTZ y, además, en este punto temporal, era significativo tanto respecto al grupo control como al de animales kindling negativo. Esta diferencia temprana en la captación de ¹⁸F-FDG en la corteza entre los animales kindling positivo y los resistentes al kindling puede detectarse mucho antes que aparezcan cambios conductuales en el animal.

El hipometabolismo cerebral en los animales kindling químico positivo contrasta con el aumento en captación de FDG en la protuberancia. Este hipermetabolismo pudiera reflejar un aumento en la actividad de las neuronas del *locus coeruleus*, que pudieran provocar un eventual aumento de la liberación de noradrenalina en el hipocampo y la corteza en respuesta a las crisis epilépticas provocadas por el PTZ.

El tratamiento con el agonista de serotonina, 8-OH-DPAT redujo en un 16,6% la tasa final de animales que alcanzaron el kindling. Este dato nos indica que el sistema serotoninérgico, a través del receptor 5HT_{1A}, estaría implicado en las crisis epilépticas, reduciendo el número de animales que alcanza el kindling y la intensidad y duración de las crisis. Sin embargo, este efecto preventivo de la instauración del kindling en los animales tratados con 8-OH-DPAT es menos eficaz que el observado en el modelo agudo, por lo que la activación del receptor 5-HT_{1A} parece tener un papel principal en la fase aguda de la epileptogénesis.

En el modelo de kindling eléctrico, el porcentaje de animales que alcanza el estado epileptiforme fue cercano al 100%. Este éxito en el protocolo empleado pudiera ser debido a que solo se han utilizado los animales que previamente se había confirmado el correcto emplazamiento del electrodo en la región CA3 del hipocampo ventral con imagen TAC. Este procedimiento de comprobación es diferente a la metodología común, en la que se comprueba la localización de los electrodos una vez terminado el protocolo de kindling eléctrico y ya sacrificados los animales.

El pretratamiento con 8-OH-DPAT produjo diferencias en las primeras sesiones de estimulación, produciendo que un 50% de los animales no mostraran una postdescarga tras un estímulo de 50 μ A por encima de su umbral (calculado en ausencia de este agonista). Sin embargo, tras 5 sesiones, todos los animales presentaron postdescarga, por lo que el efecto inicial producido por el 8-OH-DPAT evitando la aparición de postdescarga había desaparecido. Varios

grupos han observado este mismo efecto con agonistas de serotonina administrados antes de la estimulación.

La evaluación del metabolismo cerebral en este modelo de kindling eléctrico mostró un hipometabolismo tanto en la corteza del hemisferio derecho como en el estriado. La aparición de cambios en el hemisferio contralateral a la estimulación señalaría que para la consecución de crisis convulsivas generalizadas sería necesario el reclutamiento de otras estructuras, además de la estimulada, fenómeno que se ha descrito con anterioridad como transferencia positiva (Engel et al., 1978).

Por su parte, el aumento del *binding potential* del radiotrazador 18F-MPPF se ha observado en los tres modelos experimentales *in vivo* utilizados. Sin embargo, en los estudios autorradiográficos solo se ha observado el aumento del *binding potential* de 18F-MPPF en el modelo de PTZ agudo y no en los modelos de kindling químico y eléctrico. Todo esto indica que las crisis epilépticas provocan cambios agudos en el sistema serotoninérgico en varias estructuras cerebrales, independientemente del modelo experimental empleado o si el agente utilizado en el kindling es un fármaco o un estímulo eléctrico.

Los ensayos de inmunofluorescencia con antiGFAP mostraron ausencia de inflamación en todas las estructuras estudiadas de los animales sometidos a los diferentes protocolos de epileptogénesis. Únicamente los animales de kindling eléctrico mostraron marcaje de antiGFAP en la pared del ventrículo. Estos resultados descartarían que el aumento de *binding potential* del 18F-MPPF en el hipocampo y el septum fuese debido a una gliosis reactiva.

La activación del receptor 5-HT_{1A} tiene otros efectos adicionales a la hiperpolarización de la célula como la secreción de factores neurotróficos como el BDNF (Barnes y Sharp, 1999; Zhou et al., 2013). En diferentes estudios se ha observado un aumento de BDNF en el modelo de kindling en septum e hipocampo. En nuestros estudios, hemos observado un aumento del binding de MPPF en estas mismas zonas. Estos resultados sugieren que el aumento de la

actividad del receptor 5-HT_{1A} en estas áreas está relacionado con la secreción de este factor neurotrófico.

En los tres modelos experimentales utilizados en este trabajo se ha observado un hipometabolismo en todos los animales que desarrollaron crisis convulsivas generalizadas. En el modelo agudo, el hipometabolismo fue generalizado en todo el cerebro y en los modelos crónicos más localizado en hipocampo y corteza. Igualmente, todos los animales presentaron alteración en el sistema serotoninérgico independientemente del protocolo de epileptogénesis empleado. En el modelo agudo la densidad del receptor 5-HT_{1A} se encontraba aumentada en respuesta al estímulo epileptogénico. En los modelos crónicos de kindling, también se observa un aumento del *binding potential* de 18F-MPPF en todos los grupos experimentales, incluyendo los animales que no desarrollaron crisis convulsivas. En el grupo de kindling químico que no generaron crisis convulsivas presentaban también este aumento mientras que en los estudios PET con FDG no mostraron hipometabolismo cortical.

Estos resultados sugieren la participación del sistema serotoninérgico en respuesta al insulto y podría interpretarse que la serotonina, a través del receptor 5-HT_{1A}, tendría un efecto inicial de inhibición de la actividad epileptiforme, mientras que el mantenimiento del estímulo epileptogénico desencadenaría una respuesta tardía que favorecería el establecimiento de la epileptogénesis y el desarrollo de crisis convulsivas.

Introduction

Epilepsy is a chronic neurological disorder characterized by recurrent seizures that are the physical expression of excessive, synchronized, and generally self-limiting neuronal firing. Epilepsy is a common disease that integrates over 40 clinical syndromes, affecting 0.5-2% of the world population. Its etiology is diverse and in many cases unknown. Over 30% of patients are unable to control seizures despite receiving appropriate drug therapy, i.e., are refractory to medical treatment or drug-resistant epilepsies. Among all types of epilepsy, temporal lobe epilepsy is the most common and that higher rate of resistance to drug treatment presents (Morimoto et al, 2004; Theodore and Fisher, 2004; Goffin et al, 2008; Akhlaghi et al., 2012).

The basic cellular and molecular mechanisms of epileptogenesis are under investigation. Different alterations in neurotransmission systems and neural circuits reorganization that can be involved in epileptogenesis have been described. Serotonin has a wide range of functions in the CNS. Apart from its physiological role, it has been found that serotonin is involved in several neurological disorders such as Alzheimer's disease, depression, schizophrenia and epilepsy (Aznavour y Zimmer, 2007; Xi et al, 2011.). There is evidence that serotonergic neurotransmission modulates seizures in various experimental models of epilepsy. Mechanisms that increase extracellular serotonin concentration inhibit seizures, whereas the depletion of this neurotransmitter lowers seizure threshold and increases duration (Merlet et al, 2004; Bagdy et al, 2007).

There are several animal models of epilepsy that can be used for the study of epileptogenesis. These models include the kindling model and status epilepticus models. The kindling is the most used animal model of temporal lobe epilepsy. The kindling model is based on the progressive development of seizures in response to a repeated and intermittent application of subconvulsive chemical or electric stimulus. Once generalized seizures appear, alterations remain for months or years. Status epilepticus models induced by the

administration of kainic acid or pilocarpine are characterized by spontaneous and a high rate of mortality (Morimoto et al, 2004; Bertram et al, 2007).

Brain metabolic alterations in some animal models of epilepsy have also been analyzed by PET studies with 18F-FDG. In kainic acid model hypermetabolism was observed in the region of the injection in the acute phase (Sawamura et al., 2001). The pilocarpine model showed widespread hypometabolism in the early phase and located in the chronic phase (Goffin et al, 2009; Guo et al, 2009). In epileptic patients has been observed cortical interictal hypometabolism in PET studies with 18F-FDG defining the epileptogenic zone (O'Brien et al, 2008; Duncan, 2009). Other radiotracers such as 18F-MPPF and 11C-flumazenil have been used to detect the epileptogenic zone in these patients (Theodore et al., 2012).

Objectives

This thesis aims to analyze the role of the serotonergic pathway via 5-HT_{1A} receptor in epileptogenesis with a double overall objective. First, to investigate whether 18F-MPPF is a tracer of epileptogenesis *in vivo* with potential applicability in the localization of the epileptogenic zone and, second, the possible identification of a novel therapeutic target for the control and treatment of this disease. This will be explored using functional imaging techniques (microPET), the density of 5-HT_{1A} receptor and metabolic activity in different experimental models of temporal lobe epilepsy.

With this aim, two different models were developed: a model of acute seizures with PTZ and kindling model with 2 different protocols: electrical kindling and chemical kindling with PTZ.

Results

In the experiment of acute PTZ, we observed hypermetabolism in striatal neurons at the time of the seizure in PET dynamic studies. In static studies,

however, a widespread hypometabolism was obtained in the brains of animals that were administered the PTZ. The PET studies with 18F-MPPF showed increased binding of this radiotracer in animals after seizures induced by PTZ.

Treatment with 8-OH-DPAT significantly reduced the number of attacks suffered by animals by 80%, their duration by almost 50% and the behavioral level reached during the seizures.

In the kindling model, both chemical and electrical, PET studies were performed with both radiotracers at the beginning, during the second week and the end of the protocol. Moreover, as in the acute PTZ model, the effect antiepileptogenic 8-OH-DPAT was tested in both kindling protocols.

With this model only 66% of the animals subjected to the protocol reached the kindled state. The mortality rate was 16% due to *status epilepticus*. After completion of the experiments the group was divided into positive and negative kindling, as if they had reached level 5 on 3 consecutive sessions. After this subdivision cortical hypometabolism and hypermetabolism in pons was found in kindling positive animals.

In 18F-MPPF studies in this model showed increased binding potential of tracer in animals subjected to chemical kindling. However, this increase was not observed in *in vitro* studies with the same radiotracer.

In vitro studies with tritiated ligands revealed increased AMPA and NMDA glutamate receptors in kindling group. Kainate receptors, benzodiazepine and serotonin reuptaker showed no differences from the control group. Immunohistochemical studies of neurodegeneration or glial activation showed no staining.

Treatment with 8-OH-DPAT reduced the number of animals reaching the kindled state. However, mortality from this protocol was not seen modified by treatment with the 5-HT_{1A} agonist.

In PET studies with 18F-FDG in the electrical kindling model, we observed hypermetabolism in entorhinal cortex and striatum compared to the control group. These results are consistent with those observed in *ex vivo* autoradiography made once the protocol was finished.

The study of the 5-HT_{1A} receptor with 18F-MPPF radiotracer in this model demonstrated an increase of the binding potential in animals from electrical kindling group in the contralateral entorhinal cortex and the septum. However, this increase was not observed in the *in vitro* studies with this tracer.

In vitro studies with tritiated ligands showed decreased population of glutamate and benzodiazepines receptors in kindled animals. The serotonin reuptaker system presented no differences from the control group. In immunohistochemical studies of neurodegeneration no labeling was observed, but we found presence of reactive gliosis in the walls of the ventricles.

Treatment with 8-OH-DPAT prior to stimulation had no effect on the progress of the electrical kindling.

Discussion

In the model of acute PTZ, data obtained from studies with 18F-FDG reflect a pattern similar to that observed in the electrical records of neuronal activity obtained with this model. An increase of metabolic activity is observed during the ictal phase with high frequency neuronal discharges and subsequently a postictal depression during which electrical activity is significantly below the basal activity, with lower energy consumption reflected as a hypometabolism in PET images.

In animals pretreated with 8-OH-DPAT, the percentage of animals reaching seizures decreased to 75%. In addition, pretreatment with the 5-HT_{1A} agonist

reduced the duration of seizures and their intensity. These results suggest that the 8-OH-DPAT acts on 5-HT_{1A} postsynaptic receptor producing a inhibitory response through hyperpolarization of the membrane caused by the opening of potassium channels.

By splitting kindling group into two subgroups, depending on whether the state of kindling reached or not (positive and negative kindling), differences in uptake in cerebral cortex were detected. Positive kindling animals had a lower brain metabolic activity than negative kindling animals. This hypometabolism was already visible after the first 5 injections of PTZ and also at this time point was significant in both the control group and the negative kindling animals. This early difference in ¹⁸F-FDG uptake in the cortex between positive kindling animals and those that later was found to be resistant to kindling shows an underlying divergence in the brains of animals that can be detected long before the behavioral evaluation.

This hypometabolism contrasts to the higher uptake found in the pons. Hypermetabolism in the pons may reflect the activation of neurons in the *locus coeruleus*, increasing the release of norepinephrine in the hippocampus and cortex in response to seizures caused by PTZ.

The treatment with the serotonin agonist 8-OH-DPAT, reduced by 16.6% the final rate of kindled animals. This would indicate that the serotonergic system is involved in the seizures, so that activation of 5-HT_{1A} receptors by 8-OH-DPAT reduces the intensity of the seizure and, therefore, the number of animals reaching the kindling. However, this preventive effect of the establishment of kindling in animals treated with 8-OH-DPAT in this model is much less effective than in the acute model, so that activation of the 5-HT_{1A} receptor seems to play a major role in acute phase of epileptogenesis.

In the electrical kindling model, the success rate of kindling protocol was close to 100%. This could be because we have used only the animals that we had previously confirmed the correct placement of the electrode in the CA3 region of

the ventral hippocampus, unlike the common methodology, in which the animals were tested after completion of the kindling protocol and sacrifice.

Pretreatment with 8-OH-DPAT produced differences in the first sessions of stimulation, producing that only 50% of the animals showed a post-discharge after a 50 μ A stimulus above its threshold (calculated in the absence of agonist). However, after 5 sessions all animals showed post-discharge, so that the initial effect of the 8-OH-DPAT was gone. Several groups have observed this effect with serotonin agonists administered prior to stimulation.

Evaluation of cerebral metabolism in this model of epileptogenesis showed hypometabolism in both the cortex of the right hemisphere and in the striatum. The appearance of changes in the contralateral hemisphere to stimulation indicates that to achieve generalized seizures in this model the recruitment of other structures is necessary, phenomenon described as positive transfer (Engel et al., 1978).

Moreover, we observed increased binding potential of the radiotracer 18F-MPPF in the three experimental *in vivo* models used. However, we did not find differences in autoradiographic studies of binding with 18F-MPPF in chronic models of epileptogenesis. All this indicates that seizures cause acute changes in the serotonergic system in several brain structures, regardless of the experimental model used, or if the agent used is a drug or electrical stimulation.

Immunofluorescence assays with antiGFAP showed no inflammation in all the structures studied in animals submitted to different epileptogenesis protocols except ventricular wall of animals from electrical kindling, discarding that the binding potential increase of 18F-MPPF in the hippocampus and septum was due to a reactive gliosis.

Activation of the 5-HT_{1A} receptor produces additional effects to hyperpolarization of the cell as the secretion of neurotrophic factors such as BDNF (Barnes and Sharp, 1999, Zhou et al, 2013.). In different studies researchers have found an increase in BDNF in the kindling model in septum

and hippocampus. In our studies, we have observed an increase of MPPF binding in these same areas. These results suggest that the increased activity of the 5-HT_{1A} receptor in these areas is related to the secretion of this neurotrophic factor.

In all three experimental models used in this work have shown hypometabolism in all animals that developed generalized seizures. In the acute model, the hypometabolism was widespread throughout the brain and in chronic models was localized in hippocampus and cortex. Likewise, all the animals showed alterations in the serotonergic system regardless of the epileptogenesis protocol used. In the acute model, the density of 5-HT_{1A} receptor was increased in response to the epileptogenic stimulus. In chronic models of kindling, 18F-MPPF binding potential was increased in all experimental groups, including animals that did not develop convulsive seizures. The chemical kindling group that did not generate convulsive seizures also showed this increase while the FDG PET studies did not show cortical hypometabolism.

These results suggest the involvement of the serotonergic system in response to the insult and could be interpreted that serotonin, through the 5-HT_{1A} receptor, would have an initial effect of inhibition of epileptiform activity, while maintaining the epileptogenic stimulus trigger a delayed response to favor the establishment of the epileptogenesis and the development of convulsive seizures.

1. Introducción

1.1 Epilepsia

La epilepsia es una enfermedad neurológica crónica que se caracteriza por ataques recurrentes que son la manifestación física de descargas neuronales excesivas, sincronizadas, súbitas y generalmente autolimitadas. Las manifestaciones clínicas de los ataques epilépticos son variables y dependen de la zona del cerebro afectada, así como de su propagación (Ransom y Blumenfeld, 2007). Los ataques o crisis epilépticas pueden expresarse como episodios breves y transitorios como es el caso de las ausencias o las sacudidas musculares limitadas hasta la aparición de ataques convulsivos intensos y prolongados que acompañan a las crisis tónico-clónicas o el *status epilepticus*.

Es una de las enfermedades neurológicas más frecuente. Al menos entre el 0,5 y el 2% de la población padece epilepsia (Juul-Jensen and Foldspang, 1983; Morimoto et al., 2004; White, 2003; Akhlaghi et al., 2012). En los países desarrollados, la incidencia de nuevos casos aparecidos en la población general oscilan entre 40 y 70 por cada 100 000 habitantes. En los países en desarrollo, la cifra suele acercarse al doble debido al mayor riesgo de sufrir afecciones que pueden producir daño cerebral permanente.

Debido a su etiología, el tipo más frecuente (6 de cada 10 casos) es la epilepsia idiopática, es decir, sin causa conocida. La epilepsia con causas conocidas se denomina epilepsia secundaria o sintomática. Dichas causas pueden consistir en lesiones cerebrales por traumatismos o hipoxia durante el parto, traumatismos craneales graves, accidentes vasculares cerebrales, infecciones cerebrales como la meningitis, enfermedades autoinmunes, crisis febriles o tumores cerebrales (Mathern et al., 1996; Ransom y Blumenfeld, 2007).

1.2 Epileptogénesis

La epileptogénesis es el desarrollo de la epilepsia. Es un proceso activo de cambio molecular, celular y tisular que conlleva la aparición de crisis epilépticas de forma espontánea. Esto implica una secuencia de eventos que transforman un cerebro normal en uno que padece crisis. Estos cambios se producen durante un periodo latente que puede durar desde semanas a años, en el que aparecen cambios como muerte celular, *sprouting* axonal, cambios en los niveles de neurotransmisores y de sus receptores, neurogénesis y reorganización de la red neuronal que desembocan en hiperexcitabilidad y en crisis espontáneas (Stables et al., 2002; Herman, 2006; Akhlaghi et al., 2012).

Desde las primeras descripciones de Gowers en 1881, la epilepsia está considerada como un proceso de autoperpetuación: las crisis generan crisis (Bertram, 2007). Los datos clínicos y experimentales indican que una crisis lleva a otra, lo que implica un patrón continuo de daño y reforzamiento de los procesos epileptogénicos (Ransom y Blumenfeld, 2007).

Se han inferido tres causas que pudieran explicar el proceso de la epileptogénesis:

1. fallo en el mecanismo que inhibe la despolarización de neuronas,
2. aumento de los mecanismos que facilitan la excitación
3. creación de nuevos circuitos.

En todos estos casos se produce una pérdida del balance sináptico entre excitación e inhibición del cerebro. Diferentes estudios implican a más de un neurotransmisor y estructuras en el proceso de epileptogénesis (Merlet et al., 2004; Morimoto et al., 2004; Ransom y Blumenfeld, 2007; Scharfman, 2007).

En los siguientes apartados se hace una revisión de los posibles agentes implicados en el proceso de epileptogénesis.

1.2.1 Neurotransmisores

Una alteración en los niveles de neurotransmisores o de sus receptores pueden hacer perder el balance entre excitación e inhibición e inducir epileptogénesis (Morimoto et al., 2004; Ransom y Blumenfeld, 2007).

Glutamato

El ácido glutámico es el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro de los mamíferos. Los receptores de glutamato se dividen en ionotrópicos y metabotrópicos. Hay tres familias de receptores ionotrópicos: AMPA, NMDA y kainato.

La excitación mediada por los receptores de glutamato puede aumentarse a través de los siguientes mecanismos (Ransom y Blumenfeld, 2007):

- Aumentando el número de receptores
- Aumentando la liberación del neurotransmisor
- Cambiando o modulando las propiedades de estos receptores
- Extendiendo la duración del neurotransmisor en el espacio sináptico

En algunos modelos animales se ha observado que la progresión de la epileptogénesis depende de la activación de los receptores NMDA. Experimentos con antagonistas de los receptores NMDA y de los receptores AMPA, demuestran los efectos neuroprotectores y el retraso la epileptogénesis en varios modelos animales (Morimoto et al 2004). Además, tanto en modelos animales como en pacientes epilépticos, se ha observado un aumento en la expresión del receptor NMDA (Mathern et al., 1996; Ransom y Blumenfeld, 2007).

En cuanto a los receptores de AMPA, se ha descrito una reducción en la expresión de la subunidad GluR2 tras la crisis epiléptica. La falta de esta

subunidad hace que el receptor AMPA tenga mayor conductancia y permeabilidad al calcio, lo que confiere una mayor excitabilidad a la neurona (Zhang et al., 2004; Ransom y Blumenfeld, 2007). Igualmente, se han encontrado alteraciones en los transportadores de glutamato de las células de la glía tanto en modelos animales como en pacientes (Mather et al., 1996; Ransom y Blumenfeld, 2007).

Estos resultados indican que la sinapsis glutamatérgica juega un papel importante en el desarrollo de la epileptogénesis en modelos animales como el kindling. Se cree que los receptores tipo AMPA son necesarios para el inicio de las descargas epileptiformes mientras que los receptores NMDA son críticos para inducir las alteraciones sinápticas que se dan durante la epileptogénesis que el kindling. El papel del kainato en la epileptogénesis todavía no está claro (Morimoto et al., 2004).

El papel de los receptores ionotrópicos en las crisis epilépticas ha sido ampliamente estudiado, aunque se sabe poco acerca del papel de los receptores metabotrópicos en éstas. Los receptores metabotrópicos están implicados en las crisis epilépticas como se ha podido comprobar en el modelo de kindling eléctrico (Bradford, 1995; Morimoto et al., 2004). El tratamiento con agonistas de receptores metabotrópicos del grupo II y III ha demostrado tener efectos antiepileptogénicos y anticonvulsivos. Por ello, estos receptores se han convertido en una diana de interés en el desarrollo de nuevos fármacos. Además, estos receptores presentan la ventaja como diana de fármacos de producir menos efectos secundarios que los receptores ionotrópicos ya que no participan de forma tan directa en la respuesta sináptica (Morimoto et al, 2004; Alexander y Godwin, 2006).

GABA

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro de mamíferos. Otra vía por la que se puede perder el balance entre excitación e inhibición es el bloqueo del sistema inhibitorio como

se demuestra con la desactivación del GABA con la administración de bicuculina que provoca descargas epileptiformes (Uemura y Kimura, 1988).

Hay numerosas evidencias experimentales que indican que la función del sistema gabaérgico se altera con las crisis. Esta alteración puede ser la responsable de la aparición de crisis espontáneas posteriores al daño inicial provocado en la primera crisis (Ben-Ari et al., 1981; Tuff et al., 1983). Sin embargo, los mecanismos subyacentes no están claros. En pacientes con TLE, durante las crisis, el GABA aumenta en un 250-300%. Sin embargo, los niveles de glutamato lo hacen en un 550-650%, por lo que hay una pérdida del balance a favor de la excitación. El aumento de la inhibición es insuficiente para contrarrestar el aumento del glutamato (During y Spencer, 1993).

La muerte neuronal de células con función inhibitoria conduce también a un cambio en el balance sináptico a favor de la excitación. La estructura más vulnerable en este caso es el hipocampo. Además del daño, también se produce una reorganización de los circuitos que puede llevar a un fallo del sistema inhibitorio, contribuyendo así a la cronificación de las crisis. El modelo de pilocarpina es un ejemplo de la pérdida de neuronas gabaérgicas en el área CA1 de hipocampo (Morimoto et al., 2004; Ransom y Blumenfeld, 2007).

Serotonina

El papel de la serotonina en el sistema nervioso central es muy diverso. La serotonina participa en el control del apetito, del sueño, de la memoria y del aprendizaje, del estado de ánimo, de la temperatura corporal, de la maduración neuronal, entre otros, y también es el precursor de la melatonina (Lanfume y Hamon, 2000; Aznavour y Zimmer, 2007; Xi et al., 2011). En el SNC se cree que la serotonina tiene un papel predominantemente inhibitorio (Hecimovic et al., 2003). Además, el sistema serotoninérgico está alterado en enfermedades como el Alzheimer, la epilepsia, la depresión o la esquizofrenia (Aznavour y Zimmer, 2007; Xi et al., 2011).

En los mamíferos se han descrito 14 subtipos del receptor de serotonina, agrupados en 7 familias diferentes. Los receptores de serotonina son receptores metabotrópicos con 7 segmentos transmembrana acoplados a proteína G, excepto el receptor 5-HT₃, que es un canal iónico (Barnes y Sharp, 1999). Hasta ahora, se ha descrito la participación de al menos 4 subtipos del receptor de serotonina en la epileptogénesis: 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃ y 5-HT₇ (Bagdy et al. 2007).

El subtipo más estudiado y mejor caracterizado es el 5-HT_{1A}. Este subtipo se localiza principalmente en áreas límbicas del cerebro: hipocampo, septum, corteza entorrinal, amígdala y núcleo dorsal del rafe. Esta localización es similar en todas las especies. La distribución del ARNm que codifica este receptor es prácticamente idéntica.

Este receptor consiste en una proteína transmembrana de 422 aminoácidos con una estructura acoplada a proteína G (figura 1) (Barnes y Sharp, 1999; Lanfumey y Hamon, 2000; Aznavour y Zimmer, 2007).

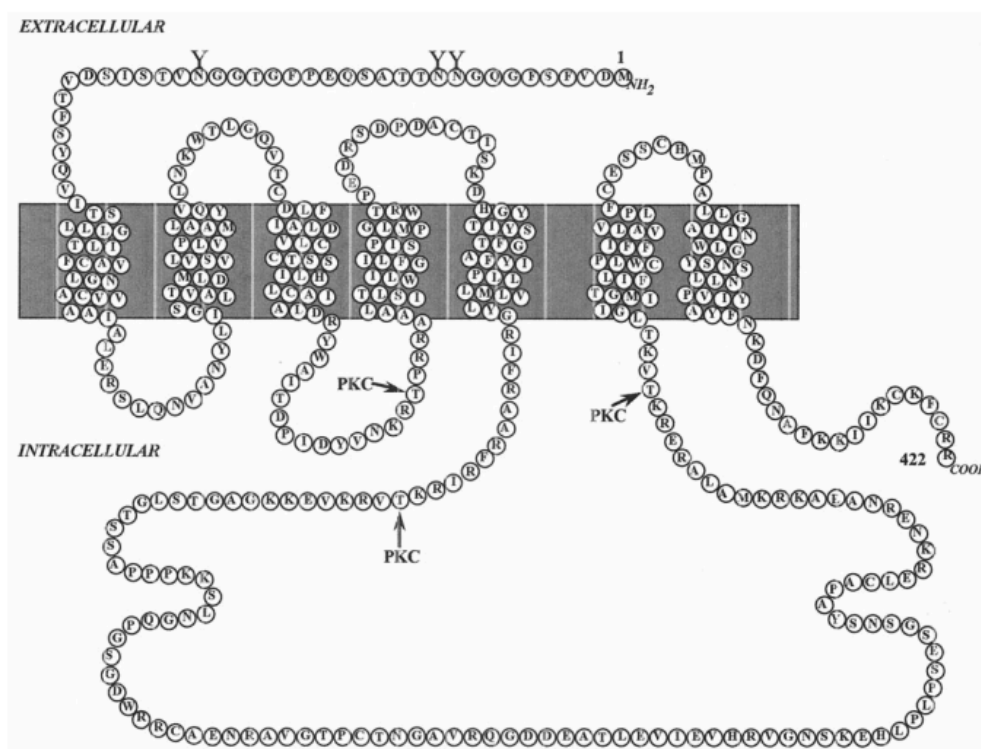


Figura 1. Estructura molecular del receptor de serotonina 5-HT_{1A} (Lanfumey y Hamon, 2000)

El receptor 5-HT_{1A}, cuando es activado, inhibe la adenil ciclasa. La serotonina actúa sobre receptores postsinápticos 5-HT_{1A} produciendo una respuesta inhibitoria a través de una hiperpolarización de la membrana producida por la apertura de canales de potasio (Salgado y Alkadhi, 1995; Barnes y Sharp, 1999; Lanfumey y Hamon, 2000; Aznavour y Zimmer, 2007). Estos receptores postsinápticos afectan a un amplio rango de condiciones fisiológicas modulando la liberación de neurotransmisores colinérgicos, dopaminérgicos, glutamatérgicos y gabaérgicos (Stein et al., 2008). Sin embargo, no parece que el mecanismo sea el mismo cuando activa los autorreceptores somatodendríticos situados en el núcleo del rafe (Barnes y Sharp, 1999).

Hay evidencias que indican que la neurotransmisión serotoninérgica modula una gran variedad de modelos experimentales de crisis inducidas. Bonnycastle et al. (1957) fueron los primeros en sugerir la idea de que la serotonina podría estar implicada en la inhibición de las crisis epilépticas al comprobar que algunos fármacos anticonvulsivos aumentaban la concentración de serotonina en el cerebro.

Los mecanismos que aumentan el nivel extracelular de serotonina inhiben las crisis, tanto focales como generalizadas, salvo en algunas excepciones, y la depleción de la serotonina disminuye el umbral en varios modelos de crisis inducidas (Merlet et al., 2004; Bagdy et al., 2007). Además, se ha comprobado que muchos fármacos antiepilépticos aumentan la concentración extracelular de serotonina. Cuando la serotonina actúa sobre los autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} localizados en el rafe inhibe la actividad de las neuronas serotoninérgicas, disminuyendo así la liberación de serotonina (Andrade, 1998; Lanfumey y Hamon, 2000; Clinckers et al., 2004; Merlet et al., 2004; Aznavour y Zimmer, 2007; Stein et al., 2008).

En el hipocampo, el receptor 5-HT_{1A} se localiza en la neuronas piramidales, pero no en las interneuronas gabaérgicas (figura 2). En estas neuronas, la

activación de este tipo de receptor de serotonina tiene un efecto inhibitorio hiperpolarizando su membrana (Andrade, 1998).

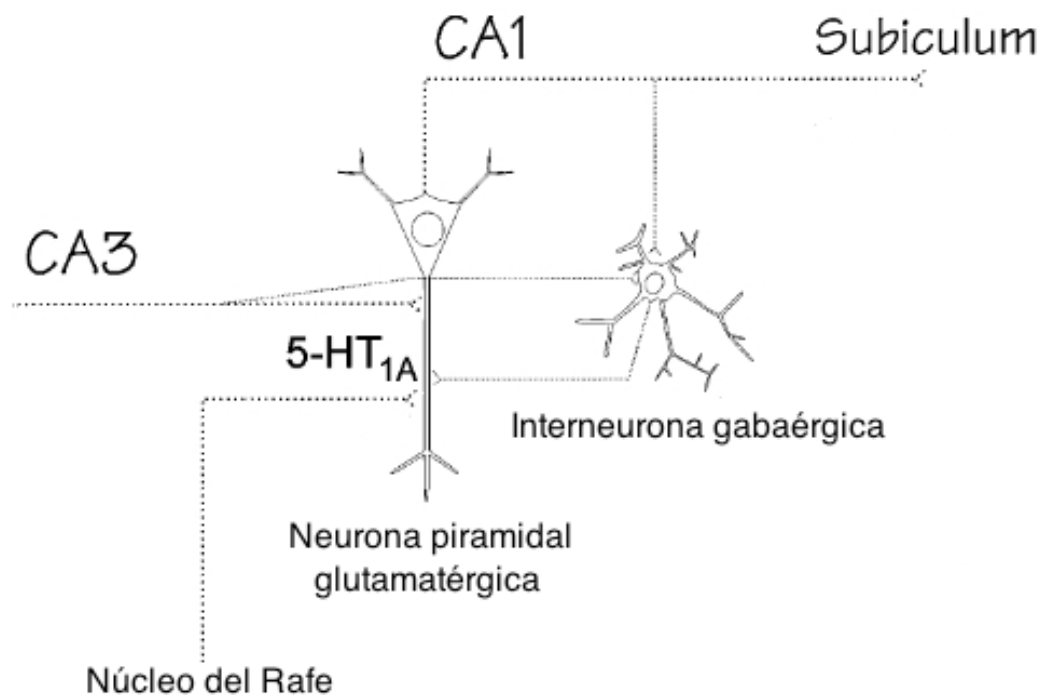


Figura 2. Localización celular del subtipo del receptor de serotonina 5-HT_{1A} en la región CA1 del hipocampo de rata (modificado de Andrade, 1998).

Además, se ha observado que el receptor 5-HT_{1A} induce la secreción de factores de crecimiento que incluyen BDNF, proteína S-100, tanto en cultivos neuronales como de astrocitos, y un aumento de receptores de glucocorticoides, por lo que este receptor posiblemente tiene un papel neurotrófico en el desarrollo del cerebro e, incluso, en el adulto (Barnes y Sharp, 1999; Zhou et al., 2013).

1.2.2 Cambios genéticos

Hay evidencias que indican que los cambios estructurales y metabólicos que se dan durante la epileptogénesis, en algunos casos, están sustentados por cambios en la expresión génica. Sobre todo, hay genes que se activan con la

actividad crítica y crean una cascada de regulación de otros genes relacionados directamente con la excitabilidad, canales iónicos, neurotransmisores, receptores, etc....

C-fos y c-jun son genes de expresión temprana que regulan la expresión de genes en hipocampo tras las crisis. Además, entre los que se activan están genes de expresión de factores de crecimiento: factor de crecimiento neuronal (NGF), neurotrofinas, factor de crecimiento endotelial, factor de crecimiento de fibroblasto y factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). El BDNF aumenta el número de sinapsis en CA1 de hipocampo, la liberación de neurotransmisor y facilita las sinapsis de potenciación a largo plazo (Binder et al., 2001; Ransom y Blumenfeld, 2007). El tratamiento con antagonistas de BDNF retrasa el desarrollo del modelo animal de kindling, lo que indica que este factor de crecimiento tiene un papel importante en la epileptogénesis (Binder et al., 1999).

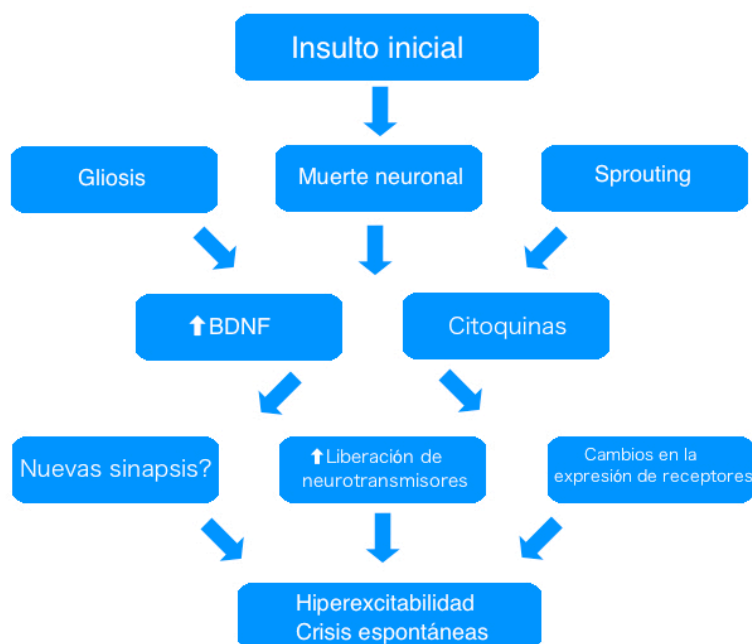


Figura 3. Esquema del papel del BDNF en la epileptogénesis. Varios estímulos diferentes pueden aumentar la expresión de este factor dando como resultado un aumento de la excitabilidad (Binder et al., 2001; O'Dell et al., 2012).

Desde hace tiempo se cree que los genes participan en el desarrollo de la epilepsia, pero es sólo desde hace 2 décadas cuando se han identificado varios genes que influyen en el riesgo de padecer diferentes tipos de epilepsia . Hay casos en los que parece que la epilepsia va ligada a la familia (Michelucci et al., 2012). En estos pacientes no hay un claro patrón de herencia, pero el número de miembros con desórdenes ictales supera claramente la proporción que se da en el resto de población. Ahora sabemos que en la mayoría de las epilepsias idiopáticas hay una herencia compleja de genes que contribuyen, ligeramente, a aumentar el riesgo de epilepsia (Bertram, 2007; Michelucci et al., 2012).

1.2.3 Cambios celulares inducidos por una crisis

El requisito para que se generen descargas epileptiformes es la activación sincronizada de poblaciones de neuronas. Para ello es necesario una reorganización compleja de las conexiones entre las neuronas que contribuya a esa activación sincronizada y rítmica (Ransom y Blumenfeld, 2007).

Las crisis aumentan la neurogénesis e influyen la conectividad y el comportamiento de estas nuevas células. Además, provocan el aumento de la arborización dendrítica que integra funcionalmente a las nuevas células en los circuitos. La sensibilidad de las nuevas neuronas a las crisis puede contribuir a la hiperexcitabilidad del circuito (Overstreet-Wadiche et al., 2006; Parent et al., 2006; Ransom y Blumenfeld, 2007).

También se forman nuevas conexiones. Una alta actividad neuronal puede inducir crecimiento axonal y sinaptogénesis en ausencia de daño neuronal. Si los nuevos circuitos son funcionales pueden contribuir a la creación de descargas epileptiformes debido a la creación de bucles excitatorios o amplificando la respuesta de la región afectada (Morimoto et al., 2004).

Glía

A parte de los cambios en las neuronas, una de las consecuencias de las crisis epilépticas es la respuesta de las células de la glía. Muchas de las funciones de la glía tras un daño en el sistema nervioso aún no se conocen. La reacción más común a estos daños es hipertrofia y la gliosis. La gliosis es la proliferación de las células de la glía y está asociada con el daño neuronal que provocan las crisis u otras patologías como ictus, neoplasmas, infecciones o inflamaciones (Khurgel e Ivy, 1996; Garzillo y Mello, 2002; Lian y Stringer, 2004; Coulter y Eid, 2012).

Se ha observado en modelos animales que las crisis epilépticas activan la microglía produciendo liberación de citoquinas. También se ha visto una elevada expresión de citoquinas en las áreas afectadas de los pacientes epilépticos. Estas citoquinas liberadas influyen la función astrocítica y su proliferación (Morimoto et al., 2004; Choi y Koh, 2008; Fabene et al., 2010; Devinsky et al., 2013).

Los astrocitos modulan la excitabilidad neuronal regulando la concentración iónica del medio, la transmisión sináptica y proveyendo a las neuronas de sustratos energéticos. Entre los iones que regula está el potasio que liberan las neuronas al espacio extracelular durante sus potenciales de acción. Esta regulación del potasio está afectada en la epilepsia, lo que provoca mayores concentraciones de potasio en el medio aumentando la excitabilidad de las neuronas. Además, también son capaces de liberar neurotransmisores, como el glutamato, en respuesta a una elevación de la concentración de calcio (Khurgel e Ivy, 1996; Araque et al., 1999; Binder et al., 2006; Ransom y Blumenfeld, 2007; Coulter y Eid, 2012; Devinsky et al., 2013).

El papel de los astrocitos en el inicio de las crisis no se conoce, pero hay indicios de que estas células participan en la epileptogénesis. Se ha observado que alteraciones genéticas en los astrocitos pueden dar lugar a crisis espontáneas en modelos animales y, que inhibiendo la función astrocítica en cerebros adultos de animales, se aumenta la susceptibilidad a diferentes

fármacos proconvulsivantes (Khurgel e Ivy, 1996; Lian y Stringer, 2004; Ransom y Blumenfeld, 2007; Devinsky et al., 2013).

1.2.4 Mecanismo prion-like

Recientemente se ha propuesto un mecanismo prion-like como el promotor inicial en procesos neurodegenerativos (Frost y Diamond, 2010). Orzi et al. (2013) proponen un mecanismo prion-like como el promotor de los cambios que se producen durante el periodo silente de la epileptogénesis. Este proceso estaría asociado con cambios en el proteosoma de ubiquitina y las vías de autofagia lisosomal.

1.3 Epilepsia del lóbulo temporal

La epilepsia no es una única enfermedad, es la manifestación de una disfunción que puede ser provocada por diferentes causas. En función de si la causa de la enfermedad es conocida, de la ubicación del foco epiléptico y de la manifestación de las crisis epilépticas, se clasifican los diferentes tipos de epilepsia (Clasificación de la Liga Internacional Contra la Epilepsia – ILAE).

De entre todos los tipos de epilepsia, la epilepsia del lóbulo temporal (TLE, del inglés, *temporal lobe epilepsy*) es el tipo de epilepsia más común y el más estudiado. La estructura cerebral más implicada en esta patología es la amígdala, el hipocampo y la corteza temporo-medial. Este tipo de epilepsia está asociado a depresión y a dificultades en el aprendizaje y la memoria. Un porcentaje elevado de paciente, alrededor del 20%, es resistente al tratamiento farmacológico (Mathern et al., 1996; Aniol et al., 2011; Wiebe, 2000; Engel, 2001; Morimoto et al., 2004; Sloviter, 2008).

Los pacientes de TLE suelen tener una historia clínica similar, con una crisis durante la infancia, muchas veces asociada a la fiebre. Otros factores que pueden predisponer a padecer esta epilepsia son lesiones durante el parto, status epilepticus o traumas cerebrales. A estos factores se les denomina lesión desencadenante inicial. Entre esta primera crisis y la aparición de las crisis epilépticas generalizadas hay un periodo latente o silente de varios años. Este periodo puede tener una duración variable probablemente dependiendo de la gravedad y la naturaleza de la lesión desencadenante (Mathern et al., 1996; Sloviter, 2008).

La Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) clasifica la TLE en la categoría de epilepsias localizadas sintomáticas. La TLE se manifiesta clínicamente con crisis con formas de precipitación específicas y patológicamente con esclerosis mesial temporal. La esclerosis mesial temporal se caracteriza por atrofia hipocampal con pérdida neuronal y gliosis reactiva (Mathern et al., 1996; Wiebe, 2000; Ransom y Blumenfeld, 2007; Sloviter, 2008). Hay evidencias de que la atrofia hipocampal que se observa en los paciente con TLE se produce a raíz de la lesión desencadenante ya que en los pacientes en los que no hay un episodio clínico durante la infancia no se observa esta esclerosis. Por ello, los pacientes sin lesión desencadenante en la historia tienen peor pronóstico en la cirugía. La esclerosis es normalmente ipsilateral, aunque en algunos pacientes puede ser bilateral. La edad a la que ocurre este primer episodio no influye en el volumen de la atrofia hipocampal. Las crisis aumentan la pérdida neuronal pero sólo tras varios años de crisis (Mathern et al., 1996).

Además de los cambios morfológicos, a nivel de glía, se dan alteraciones funcionales dando lugar a un desequilibrio en la homeostasis del potasio (Garzillo y Mello, 2002; Lian y Stringer, 2004;). En los pacientes se ha observado una elevada concentración de glutamato durante las crisis espontáneas y una menor concentración de GABA. Estos pacientes sufren alteraciones en receptores de glutamato NMDA y kainato y cambios en la acetilcolinesterasa (During y Spencer, 1993; Mathern et al., 1996).

También se observa sprouting en el hipocampo, que es más visible en los pacientes con lesión en la infancia. A diferencia de la esclerosis, el sprouting neuronal se da solo en el hipocampo ipsilateral (Mathern et al., 1996).

El hipocampo de estos pacientes no es una estructura muerta. Las neuronas del hipocampo son fisiológica y bioquímicamente activas y participan en la patofisiología de la TLE (Mathern et al., 1996).

La TLE es el tipo de epilepsia que con más frecuencia requiere tratamiento quirúrgico por su carácter focal y por su alta tasa de resistencia al tratamiento farmacológico (De Llano, 2005; Ransom y Blumenfeld, 2007). El éxito de la cirugía depende, en gran medida, en la identificación precisa del foco epiléptico (O'Brien et al, 2008; Sloviter, 2008).

1.4 Modelos animales de epilepsia

La epileptogénesis es un proceso difícil de estudiar en humanos, ya que en la mayoría de los casos, los pacientes se encuentran en la fase crónica de la enfermedad y no en el estadio temprano de la epilepsia (Löscher, 2002; Dedeurwaerdere et al., 2007). Mucho de lo que se sabe acerca de la base molecular y celular de la epileptogénesis ha sido aprendido a partir de modelos animales (White, 2002; Ransom y Blumenfeld, 2007). En estos modelos se usan normalmente roedores y primates, ya que, con alguna excepción, los circuitos cerebrales entre estas especies y el humano son bastante similares (Bertram, 2007).

Dependiendo del método de inducción de la epilepsia, los modelos de epileptogénesis se pueden dividir en dos grandes grupos: los modelos genéticos y los modelos de epilepsia adquirida. Los modelos genéticos se

generan mediante manipulación genética o selección de individuos propensos a sufrir crisis epilépticas, mientras que los modelos adquiridos se desarrollan en animales sanos a los que se les inducen crisis epilépticas mediante agentes químicos o físicos.

1.4.1 Modelos genéticos

La capacidad de manipular el genoma de ratones permite modificar genes implicados en la excitabilidad consiguiendo modelos animales de epilepsia diferentes. Estos modelos incluyen animales fotosensibles, genéticamente propensos a tener crisis y audiogénicos (Kupferberg, 2001).

Una vez que se presume que una proteína pudiera estar implicada en la epileptogénesis, la expresión del gen que la codifica puede ser manipulada para evaluar su papel en la epilepsia. Existen diversas técnicas para obtener estas alteraciones en animales: sobreexpresión del ARNm, delección de genes, ARNm antisentido o expresión de vectores (Martín y Pozo, 2006). Hay diferentes tipos de modelos genéticos dependiendo del tipo de crisis epilépticas que produce y la especie animal empleada (Pitkänen et al., 2006): los modelos de ausencia, los modelos de crisis espontánea y los modelos de epilepsia genética humana.

Los modelos de ausencia son modelos que se caracterizan por crisis no convulsivas definidas por una falta de respuesta al medio o a estímulos. Hay dos cepas de modelos genéticos de crisis de ausencia obtenidas aislando individuos en los que se observaron descargas epileptiformes sin tratamiento previo (Depaulis y van Luijtelaar, 2006): las ratas con epilepsia genética de ausencia de Estrasburgo (GAERS) y las ratas Wistar Albino Glaxo (WAG/Rij). En ambos modelos se ha demostrado que la conexión tálamo-cortical es crítica en la generación de la actividad epileptiforme. Sin embargo no se ha observado daño neurológico en el tálamo de estos animales. En las ratas GAERS sí se han visto alteraciones en la corteza como gliosis reactiva y una arborización dendrítica aberrante (Depaulis y van Luijtelaar, 2006).

Entre los modelos genéticos de crisis convulsivas espontáneas con diferente grado de malformación y severidad de las crisis podemos destacar los siguientes:

- Rata mutante *flathead* es un mutante espontáneo con notable daño neurológico, crisis epilépticas frecuentes y muerte prematura. Estos animales presentan una pérdida de interneuronas gabaérgicas que puede ser la responsable de la aparición de crisis espontáneas (Sarkisian et al., 2001).
- Ratón Otx1-/- es un mutante homocigoto que provoca crisis tónico-clónicas espontáneas y que presenta microcefalia y grosor reducido de las capas del neocortex. Además, se ha observado pérdida neuronal en capa V de la corteza lo que impide una correcta comunicación con regiones subcorticales (Acampora et al., 1996).
- Rata mutante *tish* presenta heterotopía subcortical bilateral, lo que provoca crisis espontáneas generalizadas. Se utiliza como modelo del síndrome de doble corteza en humanos (Ramos y Loturco, 2006).
- Ratón mutante p35-/. La mutación de esta proteína provoca displasia en el hipocampo y estructura citoarquitectónica interrumpida en la corteza, lo que genera crisis espontáneas en el 75% de los animales, el 25% de ellos con crisis parciales poco severas (Chae et al., 1997).

Los modelos de epilepsia genética humana se obtienen seleccionando animales que muestran respuestas convulsivas en condiciones que no provocan crisis en la mayoría de los animales. Aislado a estos animales se pueden producir colonias con rasgos epilépticos (Jobe y Browning,

2006). Dentro de este tipo de modelo, la cepa más utilizada es la de ratas genéticamente propensas a epilepsia (GEPRs). Estas ratas tienen predisposición a sufrir crisis debido a un déficit noradrenérgico y serotoninérgico (Jobe y Browning, 2006).

1.4.2 Modelos adquiridos

Estos modelos se basan en la inducción de crisis epilépticas mediante agentes químicos o físicos en animales sanos. Dependiendo de la naturaleza del agente y el tipo de crisis epilépticas que inducen, estos modelos se subdividen en 5 grupos:

- Lesiones focales – estos modelos se consiguen produciendo lesiones tales como isquemia, congelación, o la epilepsia focal inducida por inyecciones de hierro.
- Crisis febriles – las crisis son provocadas por hipertermia mediante mecanismos similares a los de la fiebre (Dubé y Baram, 2006).
- Daño por hipoxia – estos modelos se desarrollan mediante la privación de oxígeno al cerebro mediante una hipoxia general o una isquemia (Ransom y Blumenfeld, 2007).
- *Status epilepticus* (SE)– provocan crisis prolongadas de varios minutos y, tras un periodo de latencia, dan lugar a crisis espontáneas. Esto se puede lograr con la inyección sistémica o localizada de pilocarpina o ácido kaínico o con la estimulación eléctrica directa (Kupferberg, 2001; Martín y Pozo, 2006).
- Kindling – este modelo se consigue aplicando un estímulo no convulsivo al animal que, tras varias repeticiones en días consecutivos, genera una

respuesta convulsiva. El estímulo puede ser químico o eléctrico (Kupferberg, 2001).

Lesiones focales

Hay diferentes lesiones que provocan crisis epilépticas. La lesión cortical por congelación reproduce la patología de desórdenes de migración neuronal en humanos. Este modelo puede ser fácilmente desarrollado, siendo reproducible entre diferentes grupos y puede ser estudiado tanto *in vivo* como *in vitro* (Luhmann, 2006).

La administración de metilazoximetanol-acetato (MAM) es un modelo de lesión ampliamente utilizado. El MAM es un agente antimitótico que sólo tiene efecto en el sistema nervioso central. Los animales tratados con este teratógeno se consideran un buen modelo de epileptogénesis debida a una malformación cerebral (Battaglia y Bassanini, 2006).

Uno de los modelos de lesión focal más ampliamente utilizados en el pasado es el de lesión por aluminio. La aplicación de aluminio en la corteza cerebral induce la aparición de crisis epilépticas espontáneas recurrentes. Este agente genera un foco epiléptico que permanece activo durante meses e, incluso, años.

Las desventajas de este modelos son el largo periodo latente antes de la aparición de crisis espontáneas y la variabilidad observada en el éxito de este modelo en diferentes especies (Luo et al., 1987).

Modelos de crisis febriles

Estos modelos reúnen los principales elementos de las crisis febriles prolongadas de humanos. Las crisis febriles son las crisis epilépticas más comunes en niños (Stafstrom, 2002). Estas crisis suelen ocurrir entre los 3

meses de edad y los 5 años. Por ello, estos modelos se desarrollan en roedores inmaduros, aproximadamente en la segunda semana de vida (Dubé y Baram, 2006).

En estos animales se induce hipertermia aumentando la temperatura corporal hasta alcanzar una crisis epiléptica. La hipertermia utiliza la misma vía para inducir las crisis que la fiebre, la citoquina pirogénica IL-1 (Dubé y Baram, 2006).

En estos animales se ha observado daño neuronal en estructuras afectadas en los pacientes con TLE como el hipocampo. Sin embargo, no se ha reportado muerte neuronal en este modelo ni *sprouting* axonal después de las crisis (Bender et al., 2003). Una semana después del protocolo aparece una hiperexcitabilidad hipocampal que refleja unos cambios moleculares profundos (Bender et al., 2003; Dubé y Baram, 2006).

Modelos daño por hipoxia

Estos modelos se basan en la aparición de crisis espontáneas en animales en los que previamente se ha visto privado de oxígeno. Hay 2 modelos diferentes según la causa de la hipoxia (Ransom y Blumenfeld, 2007).

El modelo de crisis inducidas por hipoxia se desarrolla en animales neonatales a los que se les expone a una presión de oxígeno baja (4-7%) durante 15 minutos. Durante el proceso hipóxico se observan crisis tónico-clónicas. Además se han observado crisis espontáneas en los días siguientes al protocolo. En estos animales no se ha observado pérdida neuronal o gliosis, pero sí una hiperexcitabilidad en hipocampo y corteza que se mantiene en el animal adulto (Sanchez y Jensen, 2006).

El modelo de infarto cerebral se ha desarrollado como modelo de crisis epilépticas tras un ictus, que han sido descritas en numerosos pacientes (Kelly,

2006). Este modelo se basa en la interrupción del riego sanguíneo mediante la oclusión de la arteria cerebral media y la carótida transitoria o la fototrombosis. Pese a que muchos de los procesos bioquímicos que ocurren tras el infarto pueden contribuir a la epileptogénesis todavía no se ha descubierto la relación potencial entre la reperfusión y la epileptogénesis (Kelly, 2006).

Modelos de status epilepticus

En la actualidad existe una amplia variedad de modelos de SE. El status puede ser inducido en animales usando tanto con químicos convulsivantes como la pilocarpina y el ácido kaínico y la estimulación eléctrica de estructuras límbicas (Martín y Pozo, 2006).

PILOCARPINA

La pilocarpina es un agonista colinérgico de receptor muscarínico. El potencial convulsivo de la acetilcolina es conocido desde los años 30. La administración de pilocarpina o litio-pilocarpina en roedores induce actividad epileptiforme ictal e interictal en hipocampo y corteza produciendo alteraciones comportamentales que incluyen acinesia y automatismos faciales que progresan hasta alcanzar el SE (Cavalheiro et al., 2006).

El SE puede conseguirse mediante la administración intraperitoneal de altas dosis de pilocarpina (300 mg/kg), pero este método se acompaña de una alta tasa de mortalidad. Para disminuir la mortalidad se debe inyectar metilescopolamina (1 mg/kg) 30 minutos antes de la inyección de pilocarpina para reducir los efectos periféricos del agonista muscarínico. Además, el pretratamiento con litio reduce la dosis necesaria de pilocarpina en rata para alcanzar el SE, con lo que la tasa de mortalidad también disminuye (Marinho et al., 1998; Erakovic et al., 2000; Martín y Pozo, 2006; Müller et al., 2009).

Los animales que sobreviven al SE desarrollan crisis epilépticas espontáneas tras un periodo silente en el que no presentan convulsiones. Ya que las crisis espontáneas son una de las características más importantes de la epilepsia, el

uso de este modelo se ha incrementado de forma continua en los últimos años (Cavalheiro et al., 2006; Müller et al., 2009).

ÁCIDO KAÍNICO

El ácido kaínico es un potente agonista del receptor de glutamato, además de un inhibidor de la recaptación de este neurotransmisor (Martín y Pozo, 2006). El kainato puede administrarse por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intracerebroventricular, en una única dosis (8-15 mg/kg) o en varias dosis subconvulsivas (2,5-5 mg/kg) para provocar la aparición del SE (Dudek et al., 2006).

Este modelo tiene 3 etapas principales: el status epilepticus, el periodo latente y el desarrollo de crisis epilépticas espontáneas. Esta última etapa es normalmente permanente (Dudek et al., 2006).

Modelos de Kindling

El kindling es el desarrollo progresivo de crisis en respuesta a un estímulo subconvulsivo administrado de forma repetida e intermitente. La progresión comienza con una postdescarga de baja frecuencia y poca duración con una respuesta comportamental leve. La complejidad de la respuesta al estímulo va aumentando hasta llegar a una postdescarga de alta frecuencia y mayor duración junto con respuestas convulsiva. Una vez que las crisis se han generalizado, las alteraciones producidas persisten durante meses o años (Goddard et al., 1969; Kupferberg, 2001; McIntyre, 2006; Sutula y Ockuly, 2006). La progresión del kindling sugiere que la hiperexcitabilidad inicial va reclutando nuevos circuitos adicionales. El aumento de la duración de la respuesta con el tiempo apunta a que la resistencia natural de los circuitos

neuronales a la actividad crítica se va debilitando con el paso del kindling (Bertram, 2007).

El kindling ha sido muy estudiado como modelo de epilepsia de crisis complejas parciales con generalización secundaria. Este tipo de epilepsia es el más refractario a la terapia con fármacos antiepilépticos. Todas las especies animales sometidas al protocolo han desarrollado el kindling (McNamara, 1984; Loscher 1993; McIntyre, 2006; Sutula y Ockuly, 2006). Además, es un modelo de epilepsia en el que la alteración de la actividad neuronal se desarrolla con ausencia de un daño morfológico grave (Morimoto et al, 2004).

El kindling es una herramienta muy útil para estudiar los circuitos donde se inicia la actividad ictal y permite analizar circuitos susceptibles de crisis y cómo comienza ésta y se va expandiendo a otras estructuras. Además, este modelo nos permite controlar el momento y el lugar en el que se genera la crisis, por lo que nos permite también identificar las interacciones entre diferentes regiones y los circuitos más propensos para inducir la actividad epileptiforme. Los hallazgos hasta ahora indican que hay múltiples circuitos potenciales iniciales de crisis (Bertram, 2007).

Es el modelo animal más utilizado para el estudio de la epilepsia del lóbulo temporal por dos razones: el inicio de la actividad ictal se da en la misma zona cerebral y la actividad electroencefalográfica es similar en ambos casos, con una alta frecuencia al principio que desemboca en disparos clónicos antes de una supresión de la actividad. Sin embargo, también hay diferencias entre el modelo y la epilepsia en humanos. En el kindling, las crisis no son espontáneas, mientras que en la epilepsia sí lo son. Además, los cambios anatómicos producidos por el kindling son mucho menos pronunciados que en la enfermedad (Morimoto et al., 2004; Sutula y Ockuly, 2006; Bertram, 2007).

Al igual que en los pacientes de TLE, durante el kindling se han encontrado elevadas concentraciones de glutamato y GABA durante las crisis en el hipocampo, sobre todo una vez alcanzado el estadio 5 de la escala comportamental (Zhang et al., 1991; Ueda y Tsuru, 1995; Minamoto et al.

1992). Además, el kindling produce un aumento marcado de los potenciales postsinápticos excitatorios en el lóbulo límbico, lo que se considera que es un mecanismo que contribuye al desarrollo de la epileptogénesis (Racine et al., 1972a,b; Morimoto et al., 2004). Sin embargo, el kindling puede desarrollarse en ausencia de esta potenciación, por lo que el glutamato no es crítico en el desarrollo del kindling. El kindling reduce la inhibición mediada por GABA en CA1 de forma duradera (Kapur et al. 1989; Zhao y Leung, 1991).

En algunos estudios se ha encontrado que los receptores NMDA estaban aumentados en el giro dentado del hipocampo de animales tras el kindling (Mody y Heinemann, 1987). Sin embargo, otros autores observaron que este aumento no era permanente (Vezzani et al., 1990; Akiyama et al 1992).

También se ha encontrado cambios en los astrocitos en las estructuras que participan en el kindling en ausencia de neurodegeneración. Tras el kindling, se ha observado hipertrofia y proliferación de estas células en respuesta a las crisis repetitivas (Khurgel e Ivy, 1996).

Todas las especies pueden llegar a kindling, pero, dependiendo de la raza de roedor que utilicemos, el número de estimulaciones necesaria para alcanzar las crisis generalizadas puede variar. Estos datos apoyan la hipótesis de la participación de genes en el desarrollo de crisis epilépticas (Sutula y Ockuly, 2006; Bertram, 2007).

El kindling no suele producir muerte neuronal. Sin embargo, en el modelo de over-kindling puede aparecer esclerosis en el hipocampo (Cavazos et al., 1994; Morimoto et al., 2004). Que el over-kindling provoque crisis espontáneas significaría que puede producir epilepsia, pero estos resultados no son universales para todas las especies y laboratorios, a diferencia del kindling (Bertram, 2007).

KINDLING ELÉCTRICO

El kindling eléctrico es el tipo de kindling más frecuente. Para el desarrollo de este tipo de kindling es necesario la implantación de un electrodo bipolar en la

estructura donde queramos estimular y registrar la postdescarga. El estímulo aplicado es variable, aunque lo más común es un tren de estímulos de entre 1 y 2 segundos de duración, de pulsos bipolares de 1 milisegundo y una frecuencia entre 50 y 100 hercios (Sutula y Ockuly, 2006).

La postdescarga es el elemento más importante del kindling eléctrico. El primer paso es la determinación del umbral de postdescarga. Para ello se debe comenzar a estimular a baja intensidad e ir aumentando la intensidad progresivamente hasta alcanzar la postdescarga (McIntyre, 2006).

El intervalo interestímulo, es decir, la frecuencia con la que se le aplica el estímulo al animal, influye en la velocidad de epileptogénesis del modelo. El mejor intervalo para alcanzar el kindling con el mínimo número de estímulos es de 24 horas (Goddard et al., 1969). Sin embargo, se puede realizar un kindling rápido si se reduce el intervalo a 1 hora (Racine et al., 1973). La estructura donde se implanta el electrodo y la edad del animal también influyen en la velocidad de desarrollo del kindling (McIntyre, 2006; Sutula y Ockuly, 2006).

Conforme va avanzando la progresión de la postdescarga, el comportamiento del animal también progresa de forma estandarizada, por lo que se puede evaluar con una escala comportamental específica. Esta escala va de 0 a 5, desde una falta de respuesta comportamental hasta crisis clónicas generalizadas con pérdida del tono postural, siendo los niveles intermedios reflejo de crisis focales o parciales. Una vez alcanzado el estadio 5, prácticamente todos los animales responderán al estímulo con una respuesta del mismo nivel comportamental (Racine, 1972a,b; McIntyre, 2006; Sutula y Ockuly, 2006).

El kindling eléctrico presenta ventajas respecto a los otros modelos, como son: la activación de una estructura concreta, el desarrollo de una epileptogénesis crónica, una tasa de mortalidad mínima y la posibilidad de monitorización del desarrollo del kindling. Sin embargo, este modelo también tiene limitaciones, entre las que se podría destacar que es un procedimiento que requiere mucho trabajo, hay una pérdida potencial de animales debido al mantenimiento del

electrodo y que es un modelo que solo desarrolla crisis espontáneas después de un gran número de estímulos (Morimoto et al., 2004; McIntyre, 2006; Sutula y Ockuly, 2006).

Para el modelo de over-kindling, donde se desarrollan crisis espontáneas, se requieren entre 90 y 100 crisis de nivel 5 en rata. En este modelo se desarrollan alteraciones morfológicas similares a las observadas en pacientes de TLE (Cavazos et al., 1994; Morimoto et al., 2004).

KINDLING QUÍMICO

El kindling químico consiste en la administración repetida de agentes farmacológicos convulsivantes a dosis bajas que en una única administración no provocan crisis convulsivas y que a largo plazo producen un efecto similar al kindling eléctrico (Diehl et al., 1984; Gilbert y Goodman 2006; Sutula y Ockuly, 2006).

A los animales se les evalúa la respuesta comportamental y la actividad convulsiva. Sin embargo, durante el kindling químico, los animales no siguen el mismo patrón comportamental que con el kindling eléctrico. Por ello, debemos utilizar escalas comportamentales específicas para cada fármaco. La tasa de animales que desarrollan kindling varía en función del químico usado, la dosis, la duración del tratamiento y el intervalo entre estímulos (Gilbert y Goodman, 2006).

El kindling químico puede conseguirse con la aplicación intracerebral del agente químico pero la administración sistémica es la vía más común. Es un protocolo fácil, fiable y robusto que no requiere la implantación de electrodos en el cerebro del animal. Este tipo de kindling es altamente reproducible entre laboratorios y con diferentes especies. La mortalidad de esta técnica es baja y, con las repeticiones suficientes, la mayoría de los animales alcanzan el estado de crisis convulsivas generalizadas (Gilbert y Goodman, 2006).

La sustancia más utilizada para inducir el kindling químico es el PTZ. La administración intermitente con intervalos de 2-3 días es la forma más segura de alcanzar el kindling. Corda et al. (1991) demostraron que la administración de PTZ tres veces a la semana es la mejor forma de desarrollar el kindling, siendo mucho más eficaz que la administración 2 veces al día en la tasa de animales que alcanzan kindling.

A diferencia de la aplicación aguda de PTZ, en el kindling químico con PTZ sí se observa daño neuronal en el giro dentado del hipocampo. Sin embargo, también se ha encontrado un aumento en la neurogénesis en los animales tras el kindling con PTZ (Aniol et al., 2011).

A diferencia del kindling eléctrico, en el kindling químico obtenido por administración sistémica de agentes químicos todo el cerebro está expuesto, por lo que el modelo será diferente. Puesto que en este modelo habrá mayor participación cortical, se ha propuesto que este tipo de kindling es un modelo más cercano a la epilepsia primaria generalizada (Ono et al., 1990).

El kindling químico requiere menos estímulos que el eléctrico para alcanzar crisis generalizadas y es más sencillo.

KINDLING CON PENTILENTETRAZOL

El PTZ es un potente antagonista de GABA-A (Park et al., 2006). El PTZ atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica y bloquea selectivamente los canales de cloruro acoplados al receptor de GABA-A y está asociado a una reducción en la neurotransmisión gabaérgica en el sistema nervioso central (Padou et al., 1995; Erdogan et al., 2004; Gilbert y Goodman, 2006; Park et al., 2006).

El modelo de PTZ es uno de los más utilizados en el estudio de la epilepsia porque tiene ciertas ventajas frente a otros modelos:

1. Tiene un comportamiento durante las crisis muy característico, lo que permite una clasificación comportamental de la crisis.

2. Es un modelo de crisis hipocampal muy estudiado y estandarizado.
3. Tiene similitudes con la epilepsia del lóbulo temporal en humanos.
4. No provoca muerte neuronal.

Las crisis convulsivas generadas con PTZ tienen su origen en el prosencéfalo y se desarrollan dentro de los veinte minutos posteriores a la aplicación del PTZ (Velíšková, 2006). El modelo de PTZ genera los cuatro fenómenos comportamentales siguientes: inmovilidad, sacudidas mioclónicas o postura de canguro, ataques clónicos y ataques tónico-clónicos (Velíšek, 2006) y posteriormente genera una inhibición post-ictal (Ono et al., 1990).

Para la evaluación de las crisis con PTZ se debe utilizar una escala comportamental específica del PTZ, ya que cada modelo provoca las crisis convulsivas por diferentes métodos y por lo tanto el desarrollo comportamental durante éstas es diferente.

Este es un buen modelo animal de crisis epilépticas generalizadas (White, 2003; Erdogan et al., 2004)

Todos estos modelos se han empleado en el desarrollo y prueba de nuevos fármacos antiepilépticos. Excepto los bromuros y el fenobarbital, el efecto anticonvulsivante de todos los fármacos antiepilépticos ha sido testado en modelo animales (Löscher, 2002). Actualmente, los modelos animales de epilepsia más usados en los programas de investigación de nuevos fármacos antiepilépticos son los modelos de *status* y de crisis parciales (White, 2003; Martín y Pozo, 2006). La diferencia entre estos dos tipos de modelos es que en el caso del *status epilepticus* se consigue que los animales sufran crisis espontáneas tras un periodo silente, mientras que en el kindling solo se obtienen crisis espontáneas tras un elevado número de estimulaciones sin periodo latente.

Se han elaborado dos teorías acerca del periodo silente en estos modelos. Puede ser que la pérdida neuronal no permita el establecimiento de las crisis hasta que las conexiones se reorganicen y permitan la propagación de la

actividad epiléptica. La otra teoría se basa en que las crisis sean subclínicas y vayan evolucionando poco a poco a o largo del tiempo (Sloviter, 2008).

Sin embargo, recientes estudios han obtenido crisis espontáneas con el modelo de pilocarpina en días posteriores al *status epilepticus* sin periodo silente y atribuyen el que otros estudios no las hayan observado al bajo seguimiento hecho en los días posteriores al *status epilepticus* (Sloviter, 2008; Goffin et al., 2007).

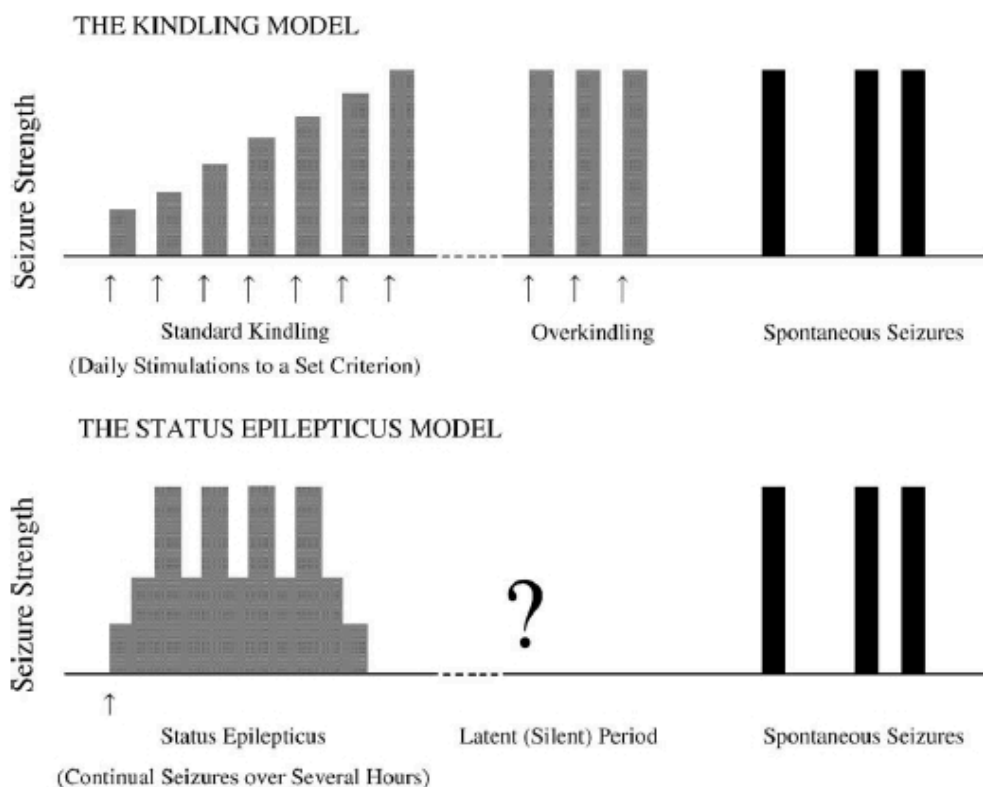


Figura 4. El desarrollo de la epileptogénesis y la aparición de crisis espontáneas en el modelo de kindling y los modelos de *status epilepticus*. Las flechas indican la aplicación del estímulo. Se puede observar como en el modelo de kindling no hay un periodo silente en el que no se aplica el estímulo. Sin embargo, en los modelos de *status epilepticus* si hay un periodo en el que no se aplica estímulo y tampoco aparecen crisis (Morimoto et al., 2004).

Además, otras desventajas de los modelos de status epilepticus frente a los de crisis parciales son su alta mortalidad y el desconocimiento del lugar donde comienza la crisis. Esa alta mortalidad hace que los datos obtenidos estén

sesgados, ya que únicamente obtenemos datos de los animales que sobreviven al *status epilepticus*. A diferencia de estos modelos, los de crisis parciales tienen una mortalidad baja y, en el caso del kindling eléctrico, se sabe el lugar específico de inicio de las crisis (Kupferberg, 2001; Löscher, 2002; Gilbert y Goodman, 2006; McIntyre, 2006; Goffin et al., 2007; Sloviter, 2008).

Modelo	Administración	Mecanismo de acción	Ventajas	Desventajas
Ác. Káinico	Altas o repetidas dosis de KA administradas i.p., i.v. o intracerebral	Induce status epilepticus	Alteraciones similares a la TLE en humanos	Alta mortalidad
Pilocarpina	Administración i.p. o intracerebral junto con litio	Induce status epilepticus	Alteraciones similares a la TLE en humanos	Mayores daños en el neocortex
Kindling eléctrico	Pequeños estímulos químicos o eléctricos repetidos	Estímulos subconvulsivos repetidos conducen a crisis inducidas pero no espontáneas	Momento y foco de la crisis controlados	No produce crisis espontáneas
Kindling PTZ	Administración de dosis subconvulsivas i.p. o i.v.	Induce crisis convulsivas generalizadas	Fácil. Responde a anticonvulsivos clásicos	Mecanismo de acción desconocido
Lesión focal	Daño directo en el cerebro	La lesión provoca cambios celulares	Provoca crisis espontáneas	Alteraciones muy heterogéneas

Figura 5. Resumen de los modelos animales de crisis epilépticas más utilizados, su mecanismo de acción y las ventajas y desventajas de cada uno de ellos (Modificado de O'Dell et al., 2012).

1.5 La tomografía por emisión de positrones en la epilepsia

1.5.1 Características técnicas de la tomografía por emisión de positrones

La tomografía por emisión de positrones (PET, del inglés, *positron emission tomography*) es una técnica de imagen molecular *in vivo*. El PET requiere de una sonda o trazador que incorpora un radionúclido (^{18}F , ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C) que emite positrones. Estos radionúclidos no se encuentran en la naturaleza y se producen por reacciones nucleares en un acelerador de partículas o ciclotrón. Un positrón es una partícula con la misma masa que un electrón pero con carga positiva.

Cuando un positrón emitido por estos radionúclidos se encuentra con electrones de las moléculas del tejido cercano, ambas partículas sufren un proceso de aniquilación y sus masas son convertidas en energía electromagnética. Esta aniquilación se produce en un tiempo muy corto (10^{-9} segundos) y emite dos fotones con la misma dirección pero en sentido opuesto y con una energía de 511 KeV (Peñuelas, 2001).

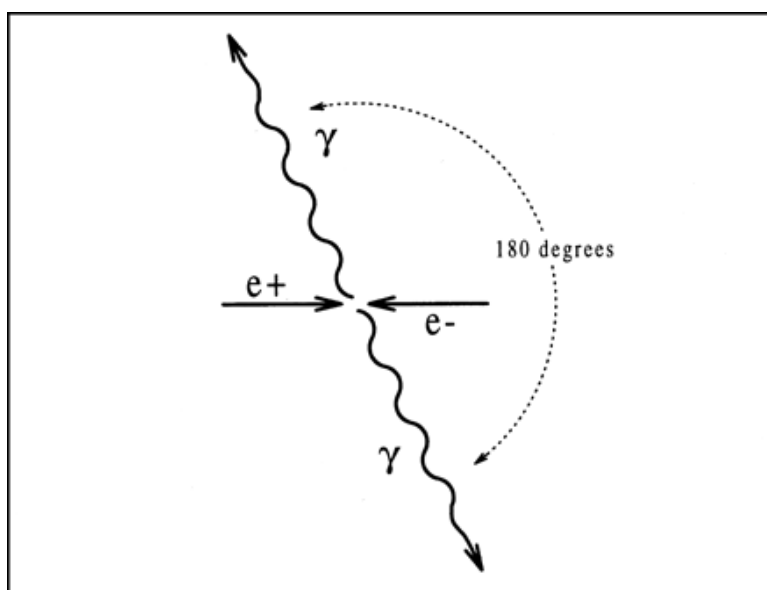


Figura 6. Esquema de la aniquilación de un positrón generando dos fotones antiparalelos de 511 KeV. (Turkington, 2001)

Esta característica de los fotones generados permite detectar y posicionar en el espacio los lugares de aniquilación mediante una cámara con cristales sensibles a estos fotones y con una geometría que permite detectar la coincidencia en el tiempo de estos fotones.

Hay tres diferentes situaciones en las que dos fotones pueden ser considerados como coincidentes:

- Evento verdadero: la línea dibujada entre ambos detectores activados por los fotones (LOR, del inglés, line of response), pasa por el punto donde se ha producido la aniquilación.
- Evento *scatter*: uno o ambos fotones resultantes de una aniquilación cambia su dirección y/o energía debido al paso a través del tejido.
- Evento *random*: dos fotones procedentes de aniquilaciones diferentes activan dos detectores en la misma ventana temporal.

Únicamente los eventos verdaderos muestran la posición real de una aniquilación, por lo que, durante la reconstrucción hay que aplicar correcciones para minimizar el ruido introducido por los eventos random y scatter.

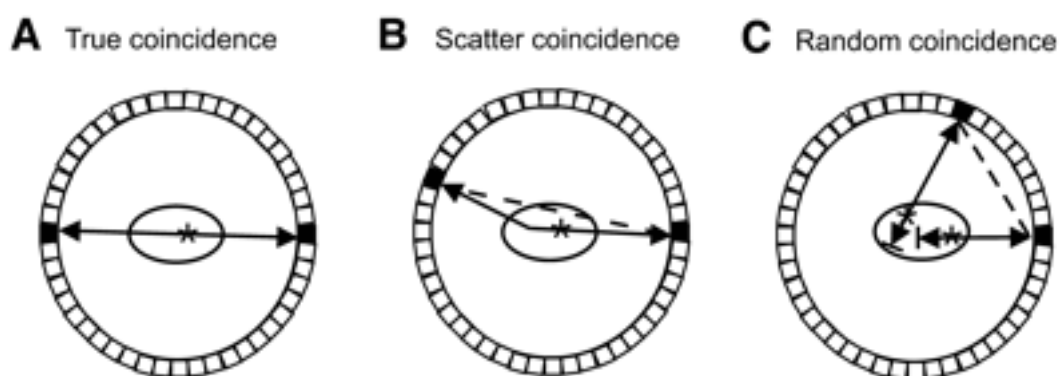


Figura 7. Representación de los tres tipos de eventos posibles. A la izquierda, un evento verdadero; en el centro, un evento *scatter*; y, a la derecha, un evento *random* provocado por dos aniquilaciones diferentes (Verel et al., 2005).

Los detectores son la parte más importante y más cara del sistema. Un detector consta de cristales inorgánicos de centelleo que absorben los fotones de 511 KeV y los convierte en pulsos de luz. Estos cristales están acoplados a fotodetectores muy sensibles, denominados fotomultiplicadores, y ensamblados en módulos. Los módulos son colocados juntos formando un anillo. El pulso de luz que llega al fotomultiplicador es convertido en una señal eléctrica que lleva la información espacial, temporal y energética del evento. Si ese evento tiene la energía correcta es registrado. La coincidencia con otro fotón se determina comparando la ventana temporal en la que se ha registrado cada uno. Si hay coincidencia se determina su línea de respuesta (LOR) y se incrementa el valor de ésta en una cuenta.

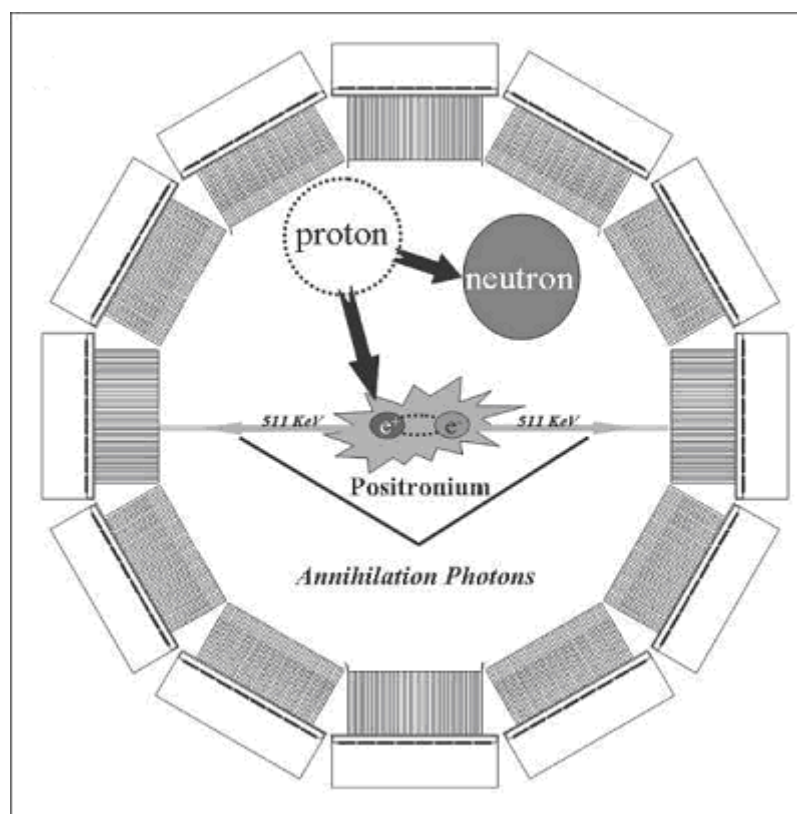


Figura 8. Esquema de la composición de un anillo de detectores de un equipo PET. (Hutchins et al., 2008)

Las sondas radiactivas o radiotrazadores marcados utilizados son administrados al animal en cantidades de traza. Los fotones emitidos por la sonda se convierten en señales eléctricas por un sistema de fotomultiplicadores adosados a los detectores. El sistema selecciona los eventos coincidentes. Todos los datos recogidos por el equipo se someten a un proceso que utiliza algoritmos matemáticos para estimar la posición de cada evento en una representación tridimensional, lo que permite obtener una visión global de la distribución del radiotrazador.

Durante la reconstrucción también se corrigen factores físicos asociados a esta técnica (Levin, 2005):

1. Atenuación: es la pérdida de energía de los fotones al atravesar el tejido. Este es el mayor factor de corrección que se aplica a los datos obtenidos en esta técnica.
2. Saturación del detector por un flujo de fotones mayor del que el equipo es capaz de registrar
3. Los eventos *random*
4. Los eventos *scatter*
5. El decaimiento del isótopo radioactivo.

La tomografía por emisión de positrones tiene varias ventajas frente a otras técnicas de imagen molecular:

- Permite la adquisición de datos cinéticos del orden de segundos, por lo que podemos analizar procesos fisiológicos o farmacológicos relativamente rápidos.
- Es una técnica muy sensible, capaz de detectar concentraciones del orden picomolar e, incluso, femtomolar de los radioligandos.
- Es una técnica potencialmente cuantitativa.
- Es mínimamente invasiva, ya que únicamente requiere inyectar la sonda radiactiva que posee una vida media muy corta (horas o minutos).

Esta última ventaja de la técnica es la que nos permite realizar varios estudios *in vivo* en el mismo sujeto y hacer un seguimiento temporal de éste, disminuyendo así el número de animales utilizados para cada estudio.

1.5.2 Radiotrazadores

18-Flúor-desoxiglucosa

El radiotrazador más utilizado, tanto en clínica como en investigación, es la 18-Flúor-desoxiglucosa (18F-FDG). Este radiotrazador se obtiene sustituyendo el grupo hidroxilo del carbono 2 de una molécula de glucosa por un átomo de flúor-18.

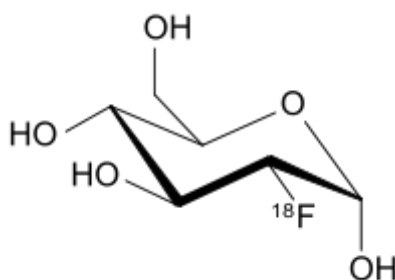


Figura 9. Molécula de glucosa en la que el grupo hidroxilo ha sido sustituido por un átomo de flúor-18. Esta molécula es denominada [18F]-Fluoro-2-desoxi-D-glucosa.

El metabolismo de FDG es similar al de la glucosa, sin embargo una vez que la FDG es fosforilada en el interior de las células da lugar a FDG-6-fosfato (FDG-6-P), que no puede metabolizarse por la vía glicolítica. La FDG fosforilada se queda atrapada en el interior de las células.

Los datos son analizados como un modelo cinético de dos compartimentos.

MODELO BICOMPARTIMENTAL DE FDG



Figura 10. Esquema del metabolismo de la FDG según el modelo de dos compartimentos. El primer compartimento representa el paso de la FDG a la célula desde el torrente sanguíneo. El segundo compartimento representa la fosforilación de la FDG a FDG-6-P. K_1 refleja el flujo de FDG hacia el interior de la célula y K_2 la salida a sangre a través del transportador de glucosa. K_3 representa la fosforilación de la FDG y K_4 la desfosforilación, que en el caso de FDG no se da, por ello es siempre igual a 0. (Selberg et al., 2002)

En este modelo obtenemos 4 constantes cinéticas. K_1 es el flujo de FDG a través del transportador hacia dentro de la célula y K_2 es la salida de ésta al flujo sanguíneo. K_3 representa la fosforilación de la FDG y K_4 es igual a 0, ya que la FDG-6-P no puede salir de la célula.

K_i es una constante que representa el flujo total de la FDG hacia el interior de la célula (Castell y Cook, 2008):

$$K_i = \frac{K_1 * K_3}{K_2 + K_3}$$

La FDG es el radiotrazador más usado para el estudio de la actividad metabólica celular.

Radiotrazadores de serotonina

En la actualidad existen únicamente radiotrazadores para los receptores de serotonina 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}. Se han desarrollado varios radiotrazadores específicos para 5-HT_{1A} derivados del antagonista WAY 100635: 11C-WAY 100635, 18F-FCWAY y 18F-MPPF (Xi et al., 2011).

El 18F-MPPF es un radiotrazador que se une selectivamente a los receptores de serotonina 5-HT_{1A}. Este receptor es densamente expresado en estructuras límbicas como el hipocampo y la amígdala.

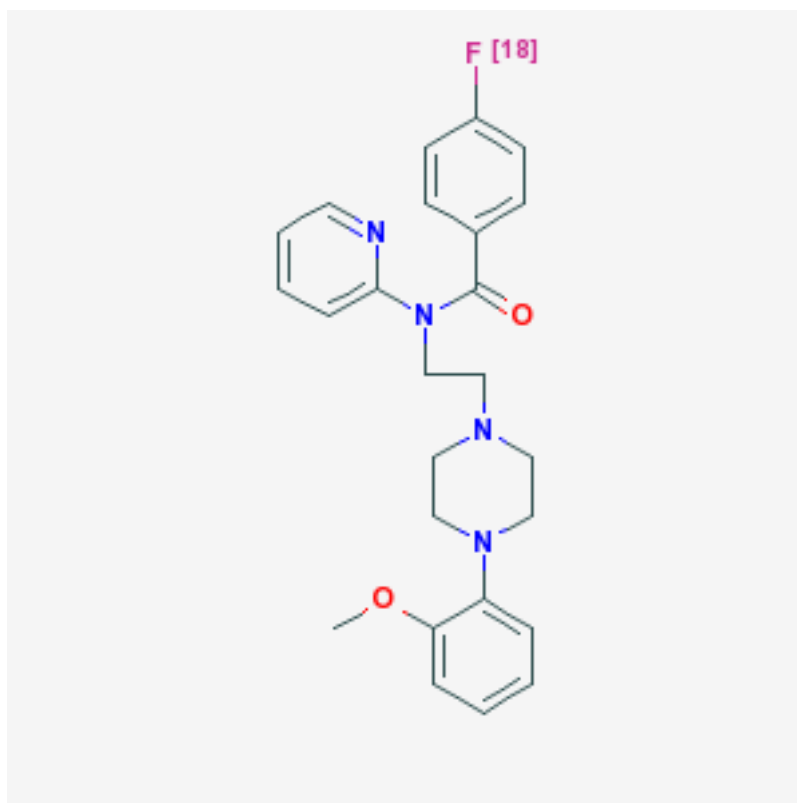


Figura 11. Estructura molecular del radiotrazador 18F-MPPF

Cuando se administra MPPF se produce una captación inicial en todas las estructuras cerebrales seguida de un lavado. La velocidad de lavado es mucho mayor en las regiones pobres en receptores 5-HT_{1A}. La curva actividad-tiempo en las regiones ricas es más lenta (Aznavour y Zimmer, 2007). El MPPF tiene una alta afinidad por el receptor 5-HT_{1A} ($K_i = 3,3\text{nM}$), similar a la de la serotonina ($K_i = 4,7\text{nM}$) y es sensible a la variación en la concentración de serotonina endógena (Merlet et al., 2004).

Además, en nuestro laboratorio, junto con otros grupos, hemos desarrollado un nuevo radiotrazador que marca receptores 5-HT_{1A} de serotonina a partir de la molécula de WAY-100635. Este nuevo radiotrazador tiene mayor afinidad por el

receptor que el 18F-MPPF y un mayor tiempo de lavado, permitiendo la realización de estudios estáticos que no son posibles con el resto de radiotrazadores específicos de 5-HT_{1A} que había disponibles hasta ahora (Patente número: P201231651, Oficina Española de Patentes y Marcas).

1.5.3 PET y epilepsia

Humanos

El hipometabolismo con 18F-FDG-PET en el foco epiléptico durante la fase intercrítica es un fenómeno conocido en los pacientes de TLE (Hong et al., 2002; Choi et al., 2003; Duncan, 2009). Este hipometabolismo ha sido usado con éxito para identificar la región candidata para cirugía de resección en los pacientes con MRI negativa (Carne et al., 2004; Duncan, 2009).

En estudios comparativos se ha comprobado que la PET es la técnica más sensible para la localización del foco epiléptico, sobre todo, en pacientes con MRI negativas. En un 60-90% de los pacientes de TLE se ha encontrado un hipometabolismo interictal. En los pacientes de epilepsia refractaria en los que no se observan alteraciones en el MRI, el 20-44% de ellos mostraban un hipometabolismo en las imágenes de FDG. Así mismo, la localización con 18F-FDG del foco epiléptico es efectiva, sobre todo, en los pacientes con MRI negativa. (Goffin et al. 2008; O'Brien et al., 2008; Duncan, 2009).

Varios estudios correlacionan este hipometabolismo con degeneración y pérdida neuronal en esta región (Diehl et al., 2003). Sin embargo, este hipometabolismo es visible también en pacientes que no presentan pérdida de volumen hipocampal (Carne et al., 2004; Theodore et al., 2004). Lamusuo et al. (2001) no encontraron correlación entre el hipometabolismo y el daño neuronal en pacientes de TLE.

Además de la 18F-FDG, también se han usado otros radiotrazadores para el estudio de la epilepsia en humanos. El PET con 11C-Flumazenilo (FMZ), trazador del receptor GABA_A, puede detectar anomalías en el hipocampo y en la corteza de pacientes con diferentes tipos de epilepsia que no muestran anormalidades en MRI, aunque no es una herramienta útil en la localización del foco epiléptico. Se observaron reducciones del *binding* de 11C-FMZ en los pacientes con mayor frecuencia de crisis (Koepp et al., 2000; Padma et al., 2004). Este tipo de estudios en pacientes tiene el inconveniente de que muchos fármacos antiepilépticos afectan al sistema gabaérgico y pueden interferir en el sitio de unión del flumazenilo (Martín y Pozo, 2006; Goffin et al., 2008).

En diversos estudios PET con radiotrazadores para 5-HT_{1A} realizados en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal se observó una disminución de la captación en regiones ipsilaterales al foco epiléptico: hipocampo y amígdala (Toczek et al., 2003; Merlet et al., 2004; Ito et al., 2007; Assem-Hilger et al., 2010). Los estudios en pacientes con 18F-MPPF muestran una disminución de receptores 5-HT_{1A} en el foco epiléptico comparado con individuos sanos. Sin embargo, esta disminución no está relacionada con la duración de la epilepsia, el intervalo desde la última crisis o la evaluación de depresión (Merlet et al., 2004; Savic et al., 2004; Didelot et al., 2008; Assem-Hilger et al., 2010; Didelot et al., 2010; Theodore et al., 2012).

En todos los pacientes se observa una asimetría en los hipocampos. Esta asimetría es mayor que la que se observa con la FDG y que en la resonancia. Sin embargo, el *binding potential* no está correlacionado con la duración de la epilepsia o la frecuencia de las crisis (Savic et al., 2004; Ito et al., 2007; Liew et al., 2009; Didelot et al., 2010).

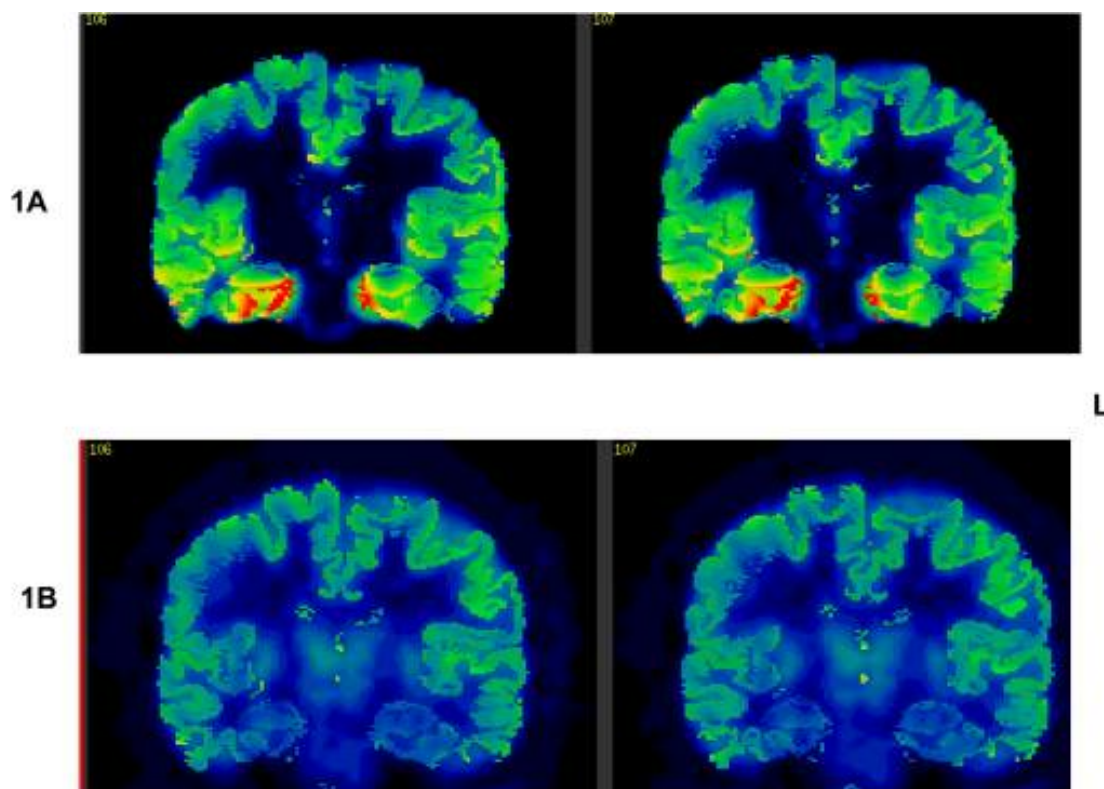


Figura 12. Imagen PET de un mismo paciente con 18F-FCWAY (superior) y 18F-FDG (inferior).

En la imagen se puede observar una asimetría en la captación del 18F-FCWAY en el hipocampo izquierdo, mientras que la asimetría en el metabolismo no es tan clara (Liew et al., 2009).

Una explicación al descenso del *binding potential* sería la atrofia del hipocampo. Sin embargo, puesto que el descenso del *binding* es mayor que la pérdida de volumen que se observa en la resonancia magnética, se deben tener en cuenta otros mecanismos, como la ocupación de los receptores por la serotonina endógena o la internalización de los receptores (Savic et al., 2004).

Modelos animales de epilepsia con PET

Las técnicas de imagen molecular *in vivo* permiten observar los cambios longitudinales que se dan en los animales vivos mejorando la fuerza estadística de los datos obtenidos en los modelos animales y reduciendo el número de animales necesarios en estos estudios. Por ello, el microPET nos posibilita el estudio de los cambios metabólicos y los procesos biológicos que se dan durante el desarrollo de una enfermedad, así como del efecto del tratamiento

en éstos (Dedeurwaerdere et al., 2007; Tai y Laforest, 2005; Goffin et al., 2008).

Además, el PET es capaz de realizar medidas similares en roedores, primates y humanos, permitiéndonos traslaciones entre la experimentación básica y la clínica (Dedeurwaerdere et al., 2007; Lancelot y Zimmer, 2010).

Un proceso que produce una breve actividad neuronal es difícil de detectar ya que el aumento de captación durante esa actividad será enmascarado por el periodo de captación en el que no se da esta actividad, ya que este sería mucho mayor (Lancelot y Zimmer, 2010). Por ello, los modelos de epilepsia crónicos son preferibles para el estudio con microPET ya que además nos permiten investigar todas las fases de la enfermedad (Dedeurwaerdere et al., 2007).

Hasta ahora, se han publicado pocos estudios que hayan utilizado la tomografía por emisión de positrones en modelos animales de epilepsia. El modelo de pilocarpina ya ha sido analizado con PET (Goffin et al., 2009; Guo et al., 2009). En los dos trabajos mencionados se observó un hipometabolismo generalizado del cerebro.

También se han realizado estudios con PET y kindling eléctrico en amígdala. En estos estudios se encontró un descenso en la captación de glucosa en el hipocampo ipsilateral respecto al hipocampo contralateral en los animales con kindling (Jupp et al., 2007).

El modelo de kainato también se ha estudiado con imagen metabólica. Sawamura et al. (2001) encontraron un hipermetabolismo en sustancia nigra, tálamo, amígdala, hipocampo y corteza piriforme y parietal tras la aplicación de ácido kaínico en sustancia nigra de ratas.

Aparte de los estudios con 18F-FDG, el PET ofrece la posibilidad de usar y probar nuevos radiotrazadores para el estudio de esta enfermedad en los

modelos animales de epilepsia, tanto para mejorar el entendimiento de los procesos metabólicos que ocurren en estos modelos como para su posterior uso en pacientes.

En el modelo animal de ácido kaínico se ha utilizado 18F-MPPF para el estudio del receptor 5-HT_{1A}. En ese estudio se realizó una autorradiografía tras una inyección única de ácido kaínico y observó una disminución del binding de MPPF en áreas límbicas del cerebro respecto a los animales controles (Van Bogaert et al., 2001). Sin embargo, hasta el momento no se han publicado estudios que utilicen este radiotrazador in vivo en modelos animales de epilepsia (Dedeurwaerdere et al., 2007).

Liefaard et al. (2009) analizaron las alteraciones del sistema gabaérgico en el modelo de kindling eléctrico y observaron una disminución del binding potential del 11C-Flumazenilo en las ratas que habían alcanzado el kindling respecto al grupo control.

Yakushev et al. (2010) estudiaron las alteraciones en el sistema dopaminérgico del modelo de pilocarpina. En este estudio encontraron una disminución del binding potential respecto a las ratas controles utilizando el radiotrazador 18F-fallypride, que es un marcador de los receptores de dopamina D2/3.

Del modelo de PTZ no se han publicado experimentos con PET, sin embargo, sí se han realizado estudios de imagen con resonancia magnética funcional (Keogh et al., 2005; Brevard et al., 2006). En estos estudios se observó un aumento de la señal segundos después de la administración de PTZ en diferentes estructuras cerebrales y un posterior descenso de ésta.

2. Objetivos

Varios estudios en modelos animales tanto *in vitro* como *in vivo*, así como estudios clínicos, han descrito un efecto anticonvulsivo de la serotonina. Sin embargo, se desconoce el mecanismo y los receptores de serotonina implicados en la modulación de las crisis epilépticas. La hipótesis de partida de este proyecto es que el sistema serotoninérgico está implicado en el mantenimiento del balance entre excitación e inhibición que controla la actividad neuronal epileptiforme generada en el hipocampo.

El presente proyecto tiene como finalidad estudiar y analizar el efecto del sistema serotoninérgico a través del receptor 5-HT_{1A} en la epileptogénesis. Con este fin, se estudiará la implicación de dicho sistema de neurotransmisión en el desarrollo de la epileptogénesis en diferentes modelos animales experimentales, mediante la técnica de neuroimagen microPET. Las técnicas de imagen molecular, como la tomografía por emisión de positrones, permiten visualizar *in vivo* la evolución temporal de estos cambios, en estudios longitudinales en el mismo animal y en diferentes modelos experimentales de epilepsia del lóbulo temporal.

De esta manera, se pretende un doble objetivo principal: determinar el papel del receptor de serotonina 5-HT_{1A} en el proceso de epileptogénesis *in vivo* y la identificación de una nueva posible diana para el control y tratamiento de esta enfermedad.

Asimismo, se evaluarán las posibles alteraciones en el metabolismo cerebral provocadas por el modelo de kindling, durante y tras la epileptogénesis, así como en un modelo agudo con PTZ. También se realizarán diferentes pruebas histológicas con el propósito de valorar los cambios producidos en glutamato y el sistema gabaérgico.

Además de estudiar el papel del receptor serotoninérgico en estos modelos, estudiaremos la capacidad del agonista 8-OH-DPAT de frenar o revertir la epileptogénesis y evaluaremos si hay diferencias en el efecto del agonista dependiendo del mecanismo epileptogénico utilizado en cada modelo.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

- Desarrollar diferentes modelos animales de epileptogénesis mediante estímulos químicos y eléctricos.
- Caracterizar las alteraciones funcionales *in vivo*, durante la epileptogénesis en el cerebro de la rata mediante la tomografía por emisión de positrones en los diferentes modelos animales.
 - Evaluar las alteraciones metabólicas con estudios con 18F-FDG como radiotrazador.
 - Evaluar los cambios en el receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} mediante estudios PET con 18F-MPPF.
- Evaluar la actividad eléctrica epileptiforme generada mediante los diferentes modelos animales.
- Evaluar el efecto antiepiléptico del agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, en los diferentes modelos de epileptogénesis desarrollados en este trabajo.
- Estudiar los cambios en la densidad de los diferentes tipos de receptores neuronales (glutamatérgicos, gabaérgicos y serotoninérgicos) debidos a las crisis epilépticas provocadas por estímulos químicos y eléctricos.
- Determinar los daños neuronales y la neurodegeneración provocados por la epileptogénesis mediante técnicas de inmunohistoquímica con ligandos tritiados e inmunofluorescencia.
- Comparar las alteraciones generales provocadas en cada modelo de epileptogénesis. Determinar qué alteraciones son debidas a la epileptogénesis y cuáles al mecanismo empleado en cada modelo.

3. Materiales y métodos

Para el estudio de los cambios producidos a nivel cerebral durante la epileptogénesis se seleccionaron 2 modelos animales de entre los más utilizados.

En primer lugar, el modelo agudo con inyección de PTZ para evaluar los cambios producidos por una crisis epiléptica en animales sin alteraciones previas. Este modelo se basa en la administración de una dosis convulsiva de este antagonista de GABA_A, ya sea en una única dosis o en dosis subefectivas consecutivas hasta alcanzar una crisis convulsiva administradas con 10 minutos de diferencia.

Además, empleamos un modelo de TLE: el kindling. El kindling es el desarrollo progresivo de crisis en respuesta a un estímulo subconvulsivo, eléctrico o químico, administrado de forma repetida e intermitente. La complejidad de la respuesta al estímulo va aumentando hasta llegar a una respuesta convulsiva (Dhir, 2012). Una vez que las crisis se han generalizado, las alteraciones producidas persisten durante meses o años (Goddard et al., 1969; Kupferberg, 2001; McIntyre, 2006; Sutula y Ockuly, 2006).

El kindling es el modelo animal de epilepsia del lóbulo temporal más utilizado, en el que la alteración de la actividad neuronal se desarrolla con ausencia de un daño morfológico grave (Morimoto et al, 2004). En nuestro caso, utilizamos dos metodologías diferentes de kindling: el químico, con PTZ, y el eléctrico.

Con el uso de estos modelos, intentamos conocer las modificaciones que se dan a nivel cerebral, tanto en metabolismo como a nivel de receptores y, también, encontrar las diferencias y similitudes entre estos dos métodos diferentes de epileptogénesis.

3.1 Animales experimentales

Para la realización de estos experimentos se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de unos 275-300 gramos de peso al inicio de cada protocolo (Harlan Interfauna, Italia). Los animales fueron mantenidos en una sala con temperatura y humedad controladas y con ciclo de 12 horas de luz, individualmente, con libre acceso a comida y agua.

Los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo con las directrices de la Unión Europea (86/609/EEC) para el uso de animales de experimentación y aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid (SAF2009-09020).

Una vez finalizados los protocolos de epileptogénesis, los animales fueron anestesiados profundamente con isoflurano y decapitados. El cerebro se extrajo rápidamente y fue congelado mediante inmersión en isopentano en hielo seco. Posteriormente, esos cerebros fueron seccionados en un criostato para la verificación de las cirugías y los estudios autorradiográficos.

3.1.1 Manejo

Previamente al comienzo de los experimentos se realizó el *handling* de los animales para habituarlos al manejo y reducir así el estrés provocado durante los experimentos.

Durante al menos 7 días se realizó este procedimiento en el que se cogía a los animales y durante algunos minutos se les sometía a la manipulación de una forma similar a la que se les realizaría durante los experimentos.

Dependiendo del modelo de epileptogénesis al que iban a ser sometidos se les realizaba una manipulación diferente. En el caso de los animales a los que se

les iba a realizar registro electroencefálico, el handling consistió en simular la conexión del electrodo al cable de registro sin llegar a conectarlos para evitar dañar la cirugía.

En los animales de kindling con PTZ se les manipulaba imitando una inyección intraperitoneal para evitar que, una vez comenzado el protocolo, el movimiento del animal durante la inyección provocará una mala administración del fármaco.

3.2 Cirugía e implantación de electrodos

Para la implantación de electrodos, se anestesió a los animales con isoflurano (5% para la inducción y 2% para el mantenimiento de la anestesia). Una vez anestesiado el animal fue posicionado y asegurado en un equipo estereotáxico (Stereotaxic Stoelting, USA) con control de la temperatura. Se expuso el cráneo del animal con un bisturí y se marcó la posición de los diferentes electrodos con ayuda del estereotáxico. Posteriormente, se trepanó el cráneo en los lugares seleccionados con ayuda de un minitaladro (Foredom Electric, USA). Dos tornillos se anclaron al cráneo del animal. El electrodo posicionado en el estereotáxico se implantó en el hipocampo izquierdo del animal y fue fijado al cráneo con cemento dental acrílico junto con los tornillos. Cuando el cemento dental se solidificó, se suturó al animal con sutura 3/0. Antes de retirar la anestesia se le administró antiinflamatorio (Rimadyl 5mg/kg) y antibiótico (Baytril 5mg/kg) por vía subcutánea. Las constantes vitales (ECG, temperatura, y frecuencia respiratoria) del animal fueron controladas permanentemente con un sistema de monitorización de pequeños animales (MR-Compatible, Model 1025, Psymtec, Madrid – España).

Posteriormente a la cirugía se dejó recuperar al animal durante 8 días antes de iniciar los experimentos.

3.2.1 Protocolo de PTZ agudo

A todos los animales de este experimento se les implantó un electrodo monopolar (MS333/1-A - Plastic One, Bilaney Consultants; Dusseldorf, Alemania) de registro de acero inoxidable, de acuerdo con las coordenadas del atlas estereotámico (Paxinos y Watson, 1986), en la región de CA1 del hipocampo (AP:-3,6; ML:+2,0; DV:-2,6), con el Bregma como referencia, un electrodo de tierra en la corteza prefrontal y un electrodo de referencia en el lóbulo parietal.

3.2.2 Protocolo de kindling eléctrico

A los animales sometidos al protocolo de kindling eléctrico se les implantó un electrodo bipolar en el hipocampo posterior izquierdo (AP -5,2, ML +5,1, DV -6,2, con el bregma como referencia), con la tierra enroscada en uno de los dos tornillos utilizados para fijar el electrodo.

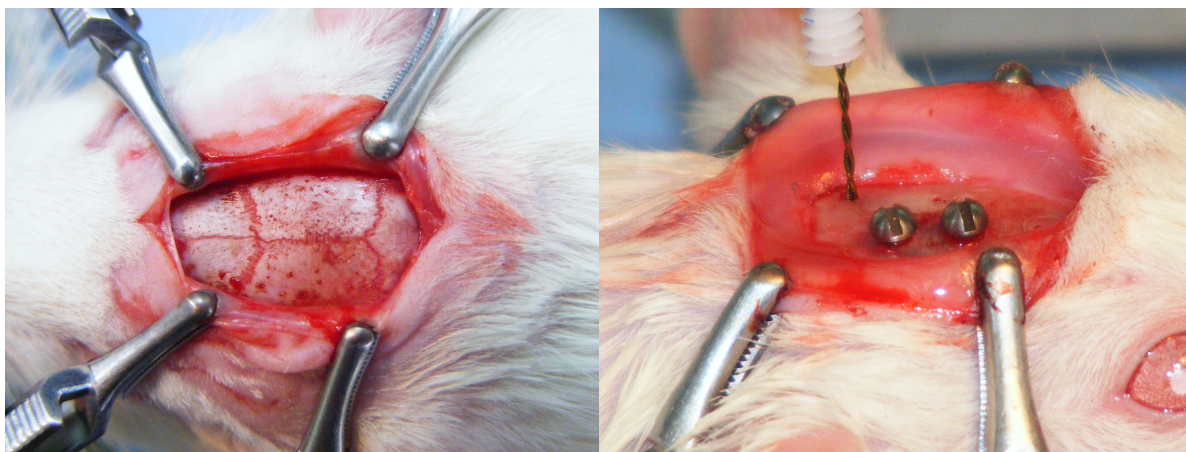


Figura 13. Imágenes de la cirugía de implantación del electrodo de estimulación en los animales de kindling eléctrico. A la izquierda se observa el cráneo del animal, donde claramente se aprecia el bregma que se toma como referencia de las coordenadas estereotáficas. A la derecha, el electrodo bipolar de estimulación antes de introducirlos a través del orificio realizado en el cráneo previamente.

Tras la operación, se les administró antiinflamatorio (Rimadyl 5mg/kg) y antibiótico (Baytril 5mg/kg) por vía subcutánea. En los días posteriores a la cirugía, el antibiótico se les administró diluido en el agua de bebida (Hipralona Enro-S, 2 ml en 100 ml de agua).

En días posteriores a la cirugía se realizó una tomografía axial computarizada (CT) a cada animal con el fin de verificar la correcta implantación del electrodo en el hipocampo ventral. Para ello se utilizó el escáner PET/CT (Albira ARS, Oncovision, España). Cada animal fue anestesiado con isoflurano y se le realizó un CT del cráneo. Una vez adquirida y reconstruida la imagen tridimensional, el CT fue corregistrado a la resonancia magnética propia de cada animal. Una vez corregistradas se aplicó un mapa de VOIs ajustado a la resonancia para verificar en que estructura cerebral estaba implantado el extremo del electrodo bipolar. Los animales en los que el electrodo no se encontraba en el hipocampo ventral fueron descartados antes de comenzar el protocolo de estimulación.

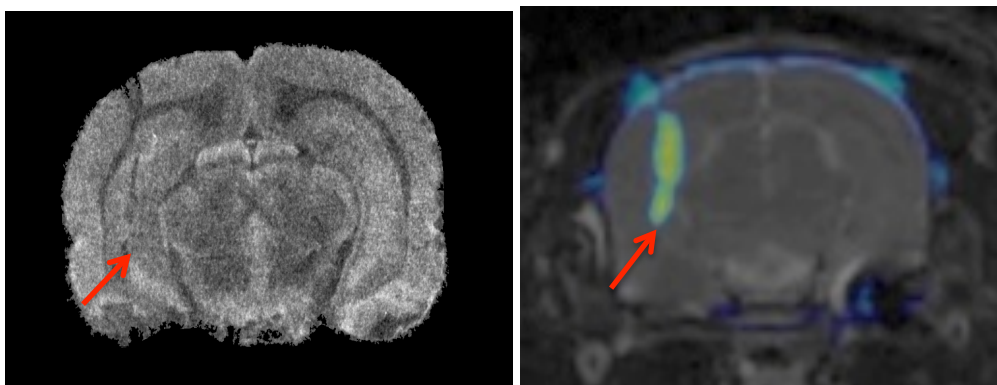


Figura 14. Comprobación mediante histología en los cortes coronales de cerebro de los animales (izqda.) de la sensibilidad del CT (dcha) para localizar el posicionamiento del electrodo al día siguiente de la cirugía. Se puede observar en la histología que el electrodo está implantado en la zona CA3 del hipocampo ventral izquierdo. El análisis de la imagen CT de ese mismo animal también situaba el electrodo en esa misma zona.

3.3 Registros electrofisiológicos

Antes de comenzar el experimento se conectó el electrodo del animal implantado previamente a un preamplificador (P55 AC, Grass Instruments; West Warwick, EEUU) mediante un cable de 3 canales. La señal fue transferida a un PC a través de un sistema de adquisición de datos (e-corder E-410, eDAQ; Denistone East, Australia). El registro fue visualizado en directo en el software Chart de este mismo sistema de adquisición, que también permitió el almacenamiento y el posterior análisis de la actividad registrada.

3.3.1 Protocolo de PTZ agudo

En estos experimentos el animal era conectado al sistema de adquisición antes de comenzar el protocolo y la actividad era registrada durante 5 minutos. Una vez inyectada la primera dosis de PTZ se registraba la actividad durante 60 minutos independientemente del número de administraciones de PTZ necesarias para cada animal.

Al final de los experimentos se analizaba la latencia hasta la primera crisis, el número de crisis sufridas por cada animal, así como la duración de éstas.

3.3.2 Protocolo de kindling eléctrico

Los animales de kindling eléctrico fueron registrados todos los días (de lunes a viernes). El animal era conectado al sistema de registro y, posteriormente a iniciar la adquisición, se le administraba el estímulo eléctrico y se seguía registrando la actividad durante un mínimo de 2 minutos hasta que desaparecía la postdescarga o, según avanzaba el protocolo, la crisis epileptiforme.

En estos animales, el electrodo de estimulación era el mismo que el de registro. Por este motivo, utilizamos un switch (HZP, Grass Instruments; West Warwick, EEUU) para evitar que se mezclaran ambas señales. Aún así, debido a este cambio de dirección de la corriente se perdía la señal durante los primeros instantes posteriores al estímulo. Esta pérdida oscilaba entre los 2 y 3 segundos. Además, para la estimulación se utilizó una unidad de aislamiento de corriente constante (PSIU6; Grass Instrument, EEUU) para ajustar la intensidad del estímulo administrado a cada animal.

En este experimento se analizó la duración de la postdescarga y la frecuencia y amplitud de ésta.

3.4 Modelos experimentales

3.4.1 Modelo de PTZ agudo

Para la generación de crisis epilépticas se empleó un modelo de administración aguda de PTZ, fármaco antagonista de los receptores de GABA_A (Ono et al., 1990; Erdogan et al., 2004). El protocolo se llevó a cabo suministrando dosis subconvulsivas por vía intraperitoneal de PTZ disuelto en NaCl (0.9 %) y consecutivas hasta que el animal alcanzaba el nivel 4-5 de la escala comportamental. Para ello se administraron dosis decrecientes de PTZ por vía i.p. cada 10 minutos de 40, 20 y 10 mg/Kg.

Todos los experimentos se realizaron con el animal consciente en una urna circular de metacrilato diseñada en la Unidad de Cartografía Cerebral (figura 15). Para evaluar el comportamiento del animal se realizó la captura en video mediante cámara web (Quickcam Pro 9000, Logitech) de su actividad durante los experimentos.

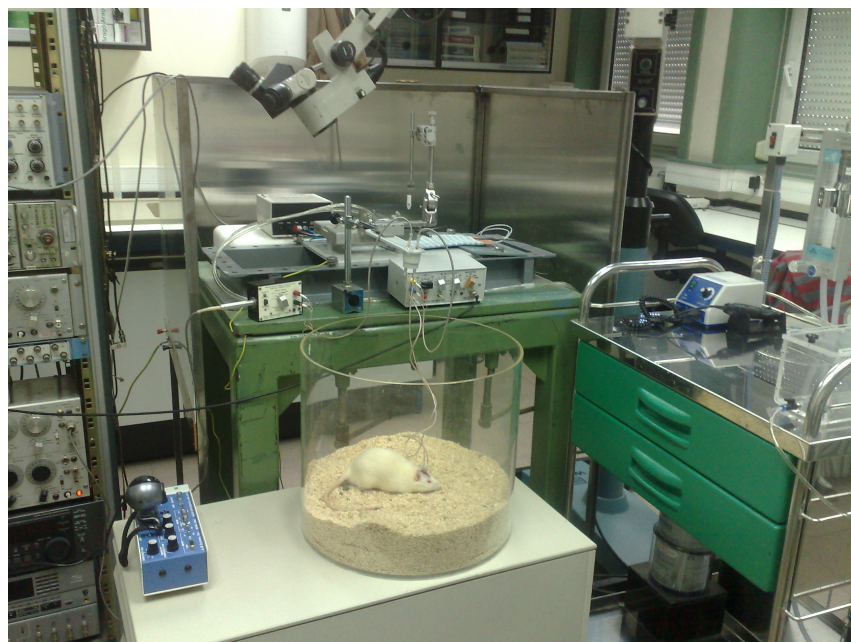


Figura 15. Sistema de registro electroencefalográfico de la Unidad de Cartografía Cerebral. El animal se sitúa en una urna circular de metacrilato para permitir el movimiento del animal y su filmación durante los experimentos. El cable de registro está conectado a un preamplificador Grass y éste a un sistema de registro eDaq.

3.4.2 Modelos de Kindling

Modelo de kindling con PTZ

Tras un periodo de habituación de los animales tras su llegada se comenzó el protocolo de kindling químico con dosis subconvulsivas de PTZ. Este protocolo consiste en la inyección intraperitoneal de PTZ a una dosis subumbral (35mg/kg) cada 48h de lunes a viernes (Carmody y Brennan, 2010). Tras cada inyección se observó el comportamiento de cada animal durante 30 minutos evaluando la progresión del kindling químico. Se continuó el protocolo de inyecciones cada 48 horas hasta que los animales presentaron crisis convulsivas en tres sesiones consecutivas.

A estos animales se les realizaron 3 estudios de imagen PET con cada uno de los radiotrazadores (18F-FDG y 18F-MPPF): un estudio basal, uno durante la

epileptogénesis y un último estudio una vez finalizado el protocolo de kindling con PTZ (figura 16).

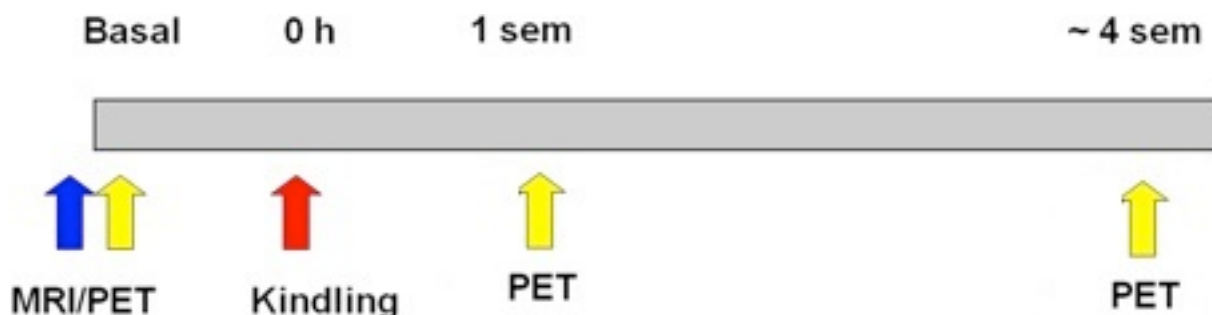


Figura 16. Cronología de los estudios de imagen realizados a los animales de Kindling químico con PTZ de los 4 grupos.

Al finalizar el experimento, todos los animales fueron decapitados y el cerebro seccionado en el plano coronal a -20°C en un criostato en rodajas de 40 µm desde bulbo olfatorio hasta cerebelo. Estos cortes fueron utilizados para los diferentes estudios de autorradiografía con ligandos tritiados o marcados con flúor-18.

Modelo de Kindling eléctrico

Tras la llegada de los animales se les realizó *handling* todos los días para disminuir el estrés de la manipulación durante las estimulaciones. De 7 a 9 días después de su llegada se les implantaron los electrodos.

ESTÍMULO

El estímulo consiste en un tren de 60 Hz durante un segundo aplicado a través de una unidad de aislamiento (PSIU6; Grass Instruments; West Warwick, RI, USA) controlado por un estimulador (S88; Grass Instruments). La intensidad de estimulación fue fijada el día 0 para cada rata según el umbral en el cual apareció la postdescarga y aumentándolo en 50 µA.

Para detectar el umbral de cada animal, se conectó el electrodo al estimulador y se aplicó el estímulo a una intensidad baja (50 μ A) y se observaba el registro. Si no aparecía una respuesta, se aplicaba otro estímulo aumentando en 25 μ A la intensidad hasta que aparecía la postdescarga. Una vez que se observaban varias descargas sincrónicas durante los segundos posteriores al estímulo, se consideraba que se había obtenido la postdescarga y se fijaba esa intensidad como umbral del animal.

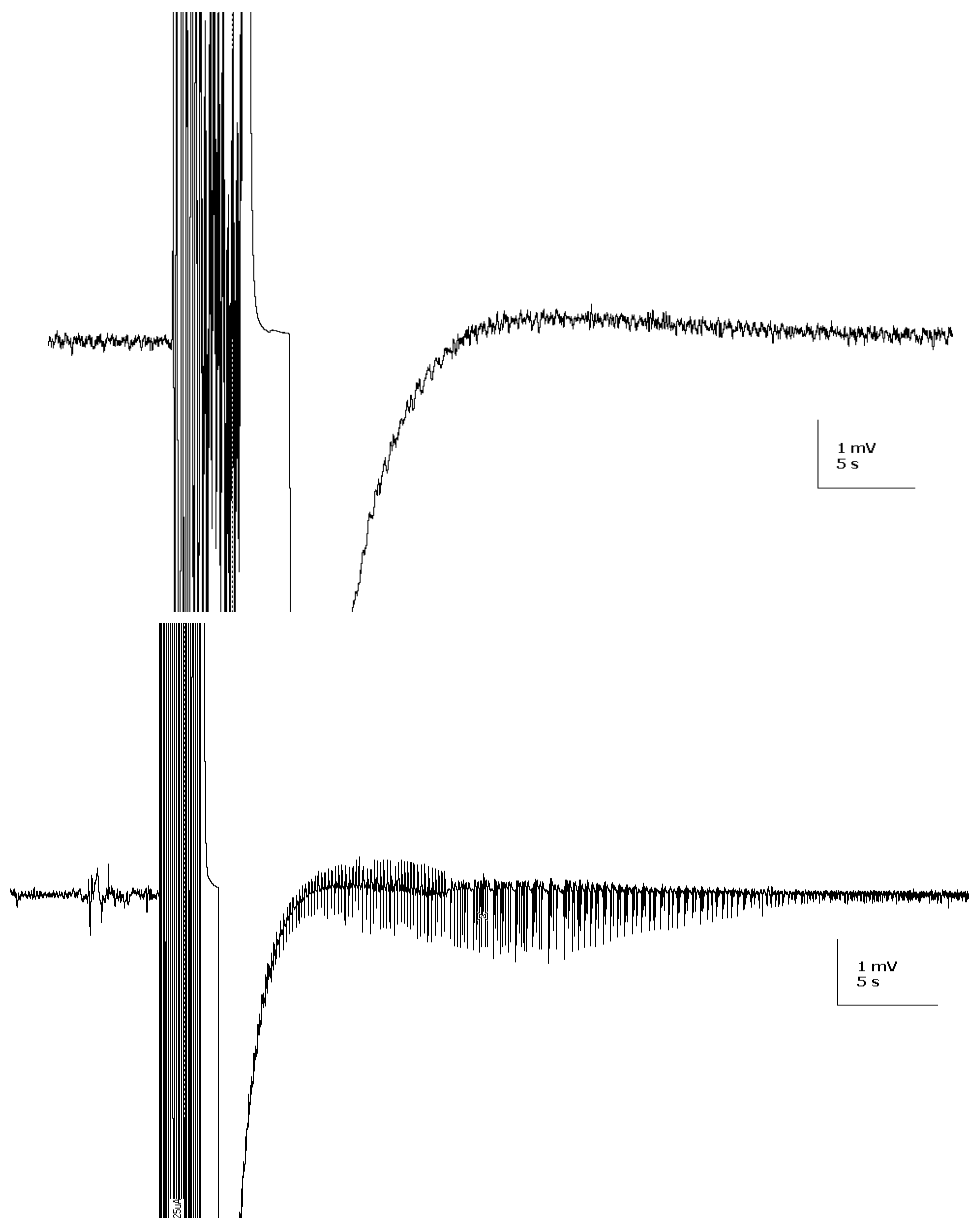


Figura 17. Imagen de la actividad en la región CA3 del hipocampo ventral del mismo animal tras la aplicación del estímulo. Arriba, respuesta a un estímulo con una intensidad menor al umbral de postdescarga. En la parte inferior, la postdescarga provocada por un estímulo de intensidad superior al umbral.

A cada rata se le aplicó un estímulo cada 24 horas (lunes-viernes) al mismo tiempo que se registraba la respuesta eléctrica. Durante todo el proceso se grabó el comportamiento del animal en vídeo para el posterior análisis comportamental. La estimulación eléctrica continuó hasta la finalización de la obtención de kindling. La finalización del kindling se consideró cuando las convulsiones o la etapa 5 se observaron durante 3 días consecutivos.

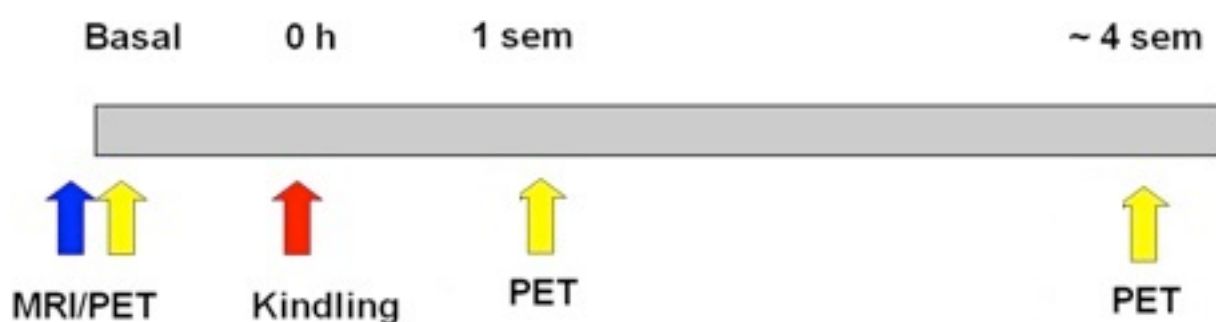


Figura 18. Cronología de los estudios de imagen realizados a los animales de Kindling eléctrico de los 4 grupos.

Una vez finalizado el kindling, se sacrificó a los animales y se les extrajo el cerebro. Posteriormente, los cerebros fueron utilizados para los estudios *in vitro*, tanto de receptores como de inflamación y neurodegeneración.

3.5 Tratamiento con 8-OH-DPAT

En los 2 modelos animales de epilepsia se quiso probar el efecto del agonista de serotonina 8-OH-DPAT actuando a través del receptor 5-HT_{1A}. En los 2 modelos diferentes de epileptogénesis (PTZ agudo y kindling, tanto químico como eléctrico) el tratamiento con 8-OH-DPAT fue idéntico. La administración se realizó por vía subcutánea a una dosis de 1 mg/kg disuelta en salino 30 minutos antes de comenzar el protocolo de epileptogénesis. En el caso de los

protocolos de kindling, el tratamiento fue subcrónico, administrando a los animales el agonista de 5-HT_{1A} todos los días que se les suministraba el estímulo. En el caso del protocolo de PTZ agudo, se les aplicaba una única inyección de 8-OH-DPAT el día del experimento.

Para la valoración del efecto anticonvulsivo de este agonista de serotonina se evaluaron tanto la respuesta comportamental como electrofisiológica, el número de estímulos o la dosis necesarios para alcanzar las crisis convulsivas y la duración de éstas.

3.6 Grupos experimentales

3.6.1 Protocolo de PTZ agudo

En los estudios con el modelo de PTZ agudo los animales utilizados fueron divididos en 2 grupos experimentales de la siguiente manera:

1. grupo de control experimental en los que se administró PTZ (n=8)
2. grupo pretratado con 8-OH-DPAT antes de la administración de PTZ (n=8)

3.6.2 Protocolos de kindling

Kindling de PTZ

Para la realización de este experimento se dividieron los animales en 4 grupos con el mismo números de sujetos en cada uno de ellos:

- Grupo A → salino
- Grupo B → PTZ 35mg/kg
- Grupo C → Salino + 8-OH-DPAT
- Grupo D → PTZ 35mg/kg + 8-OH-DPAT

El primer grupo fue el control, en el que se le administraba salino por vía intraperitoneal. A los animales del grupo B se les realizó el kindling de PTZ, inyectando una dosis de 35 mg/kg de PTZ disuelto en salino. En los grupos C y D se les administró el agonista de 5-HT_{1A} por vía subcutánea 30 minutos antes de la inyección de salino o PTZ respectivamente.

Kindling eléctrico

Los animales se dividieron en 4 grupos experimentales con el mismo número de individuos al inicio del protocolo:

- Grupo A → Sham + salino
- Grupo B → Kindling eléctrico + salino
- Grupo C → Sham + 8-OH-DPAT
- Grupo D → Kindling eléctrico + 8-OH-DPAT

El primer grupo fue el control, en el que se les implantó el electrodo en el hipocampo ventral. A los animales de este grupo se les conectada el cable de estimulación pero sin llegar a estimular. Al grupo B se les realizó el kindling eléctrico, estimulando el área CA3 del hipocampo ventral a través del electrodo bipolar implantado. En los grupos C y D se les administró el agonista de 5-HT_{1A} por vía subcutánea 30 minutos antes del protocolo de kindling eléctrico. A los sujetos del grupo C, similarmente al grupo A, se les conectó al estimulador pero sin liberar el estímulo con el fin de que todos los animales de este experimento sufrieran el mismo estrés por la manipulación. Los animales del grupo D sí fueron estimulados diariamente con un estímulo 50 μ A superior al umbral de cada sujeto.

Modelos de epileptogénesis	Grupos experimentales	
PTZ agudo	PTZ	PTZ + 8-OH-DPAT
Kindling PTZ	Control	Control + 8-OH-DPAT
	Kindling PTZ	Kindling PTZ + 8-OH-DPAT
Kindling eléctrico	Control	Control + 8-OH-DPAT
	Kindling eléctrico	Kindling eléctrico + 8-OH-DPAT

3.7 Evaluación comportamental de las crisis

Al utilizar diferentes modelos de epileptogénesis no se puede utilizar la misma escala comportamental ya que las características de las crisis provocadas por cada protocolo tiene sus particularidades que son importantes para identificar la fase de desarrollo de la epileptogénesis.

3.7.1 Protocolo de PTZ agudo

Para evaluar la evolución comportamental de este modelo de crisis epilépticas no podemos utilizar la escala de Racine ya que esta escala fue desarrollada para el kindling eléctrico y describe aspectos específicos que se dan en ese modelo que pueden no aparecer en el de PTZ. Además, en la escala de Racine faltan episodios comportamentales muy característicos del modelo de PTZ como es la postura de canguro. (Ono et al., 1990; Lamberty y Klitgaard 2000; Velísek, 2006; Velíšková 2006; Luttjohann et al., 2009).

Durante los 60 minutos posteriores a la primera inyección de PTZ se observó el comportamiento del animal para evaluar el nivel de crisis convulsiva. La evaluación comportamental se realizó teniendo en cuenta la escala comportamental desarrollada por Lamberty específicamente para este protocolo (Lamberty y Klitgaard, 2000):

Nivel 0 → Inmovilidad

Nivel 1 → Asentimiento y estereotipos faciales

Nivel 2 → Espasmos en las extremidades anteriores

Nivel 3 → Levantamiento sobre las patas trasera (postura de canguro)

Nivel 4 → Convulsiones clónicas

Nivel 5 → Convulsiones tónico-clónicas

3.7.2 Protocolos de kindling

Protocolo de kindling químico con PTZ

Para la evaluación de las crisis en los animales de este experimento se utilizó una escala similar a la del protocolo con PTZ agudo con ligeras modificaciones en las primeras etapas de las crisis. Tras cada inyección se observó el comportamiento de cada animal durante 30 minutos evaluando la progresión del kindling químico en función de una escala comportamental con 6 niveles (Diehl et al, 1984):

Nivel 0 → sin cambios

Nivel 1 → movimientos faciales, aspirar, asentir con la cabeza, correr

Nivel 2 → espasmos a través del cuerpo

Nivel 3 → tirones mioclónicos; postura del canguro

Nivel 4 → convulsiones clónicas

Nivel 5 → convulsiones tónico-clónicas

Protocolo de kindling eléctrico

Las crisis de kindling eléctrico se clasifican según la escala de Racine (1972), de la siguiente manera:

- Etapa 1, la detención de comportamiento o de la boca / los movimientos faciales,
- Etapa 2, asentir con la cabeza,
- Etapa 3, espasmos en extremidad anterior;
- Etapa 4, *rearing* (levantarse sobre las patas traseras)
- Etapa 5, caída

En esta escala se representan los aspectos más típicos de las crisis producidas por la repetición de estímulos eléctricos.

3.8 Estudios de imagen *in vivo*

Estos estudios fueron llevados a cabo en un equipo híbrido PET/CT de pequeños animales Albira ARS (Onconvision, España). Este equipo tiene un campo de visión (FOV, del inglés, *field of view*) de 40x40 mm, con una resolución de 1,3 mm en el centro del FOV (Balcerzyk et al., 2009).



Figura 19. Escáner híbrido PET/CT de pequeños animales Albira ARS del CAI de Cartografía Cerebral de la Universidad Complutense de Madrid en el que se realizaron todos los estudios de imagen PET.

3.8.1 Estudios PET con 18F-FDG

Para el estudio de las alteraciones en el metabolismo cerebral se utilizó la 18F-FDG como radiotrazador. Este radiotrazador sigue la misma ruta metabólica que la glucosa con la diferencia que una vez que es fosforilada no continúa la vía glicolítica y se queda atrapada en la célula (Selberg et al., 2002).

Las imágenes de estudios PET se reconstruyeron con un algoritmo OSEM cross de 3 iteraciones con correcciones *scatter*, *random* y por *decay*. Estas imágenes fueron corregistradas a la resonancia de cada animal. Una vez corregistradas, se les aplicó un mapa de VOIs dibujados sobre la resonancia y se obtuvo la captación de diferentes estructuras cerebrales. El análisis de las imágenes PET se realizó mediante los módulos Pview y Pfus del software Pmod 3.0 (PMOD software, Suiza).

La captación de cada estructura se normalizó a la actividad del cerebelo y se comparó con el grupo control mediante un test t de Student, considerando que la diferencia era estadísticamente significativa cuando el valor de p estaba por debajo de 0,05.

Protocolo de PTZ agudo

A los animales utilizados para este protocolo se les sometió a dos tipos de estudios PET con el análogo de la glucosa, 18F-FDG: estudios estáticos y estudios dinámicos.

En primer lugar se les realizaron 2 estudios PET estáticos a cada animal. El primero de los estudios se usó como control de ese mismo animal que, posteriormente, se le realizaría el estudio con PTZ. Para ello, a los animales se les inyectó 500µCi de FDG por vía intraperitoneal y, 5 minutos después, se le administró el PTZ (Sigma Aldrich Química, S.A. Barcelona, España), también intraperitonealmente, en una dosis convulsiva de 70 mg/kg. En el caso del estudio control al animal se le inyectaba salino 0,9% en lugar del PTZ.

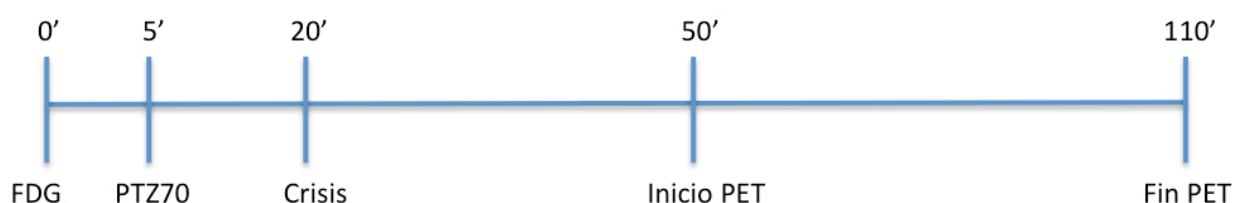


Figura 20. Representación cronológica del estudio de adquisición estática de la captación de 18F-FDG para evaluar el efecto de la inyección de una dosis convulsiva de PTZ. Se administra 18F-FDG antes de comenzar el protocolo de PTZ. Treinta minutos después de que se produzca una crisis de nivel 4 ó 5 comienza la adquisición PET.

Durante los minutos posteriores a la inyección del PTZ se observó el comportamiento del animal para evaluar el nivel de crisis convulsiva según la escala de Lamberty (Lamberty y Klitgaard, 2000). A los 30 minutos de la aparición de la crisis convulsiva se inició la adquisición PET.

En el caso de los estudios dinámicos, de la misma manera que en los estáticos, a cada animal se le realizaron dos estudios PET. El primero, en la situación control (inyectándole salino), y el segundo con la aplicación de una única dosis de PTZ (70mg/kg). De esta forma cada animal sirvió como control de sí mismo, reduciendo así la variabilidad. En ambos casos, se realizó un estudio dinámico de la incorporación de 18F-FDG en cerebro.

Para el estudio dinámico se anestesió a los animales con isoflurano (2%) y, una vez posicionados en la camilla se les inyectó PTZ (70mg/kg) o salino intraperitonealmente, según correspondiese. A continuación, se inició el escáner PET y se les administró FDG (400μCi) por vía intravenosa. La duración del estudio PET fue de 70 minutos obteniendo 27 frames de diferente duración (4x15"; 4x30"; 4x60"; 4x120"; 5x180"; 4x300"; 2x600").



Figura 21. Representación cronológica del estudio de adquisición dinámica de la captación de 18F-FDG para evaluar el efecto de la inyección de una dosis convulsiva de PTZ. Se administra PTZ a la vez que se comienza la adquisición PET. Diez segundos después de comenzar el estudio se inyecta la dosis de 18F-FDG.

Protocolos de kindling

Como ya se señaló anteriormente, a los animales de kindling se les realizaron 3 estudios PET con 18F-FDG: el basal, antes de comenzar el protocolo de kindling; uno intermedio, en la segunda semana del protocolo; y el estudio final, una vez completado el protocolo.

Todos los estudios PET con 18F-FDG realizados con los animales de kindling, tanto químico como eléctrico, fueron estudios estáticos de 20 minutos de duración con un estudio CT posterior en la misma posición sin que el animal se despertara entre ambos estudios. Los animales fueron anestesiados con isoflurano al 5% y se les inyectó una dosis de 500 µCi aproximadamente. La incorporación de 18F-FDG fue con los animales despiertos. Tras 30 minutos de incorporación se volvió a anestesiarse a los animales y se mantuvieron anestesiados con isoflurano al 2% durante la adquisición de las imágenes PET-CT.

3.8.2 Estudios PET con 18F-MPPF

Las constantes cinéticas de la unión del 18F-MPPF al receptor 5-HT_{1A} se obtuvieron mediante estudios PET dinámicos. Para ello se anestesió a los animales con isoflurano al 5% y se les colocó una cánula en la vena caudal. Una vez fijada la cánula se les colocó en el escáner en la posición de adquisición PET. Posteriormente se les administró la dosis de 18F-MPPF (400µCi) a través de la cánula a la vez que se inició la adquisición PET. Las ratas se mantuvieron anestesiadas durante todo el estudio.

La adquisición PET constaba de 25 frames de duración creciente durante un total de 45 minutos (1x10"; 6x30"; 8x60"; 2x120"; 5x180"; 3x300"), inyectándosele al animal el radiotrazador al comienzo del segundo frame. El CT se realizó en la misma posición una vez finalizada la adquisición PET. Las

imágenes dinámicas PET se reconstruyeron con un algoritmo OSEM cross de 3 iteraciones con correcciones *scatter*, *random* y por *decay*.). La imagen average de cada estudio se corregistró a la de resonancia del mismo sujeto y posteriormente se aplicó esa misma transformación a la imagen dinámica.

Los datos dinámicos de estos estudios se analizaron en el módulo PxMOD de PMOD software (PMOD Technologies, Suiza) para la obtención de un mapa paramétrico del *binding potential* de cada estudio utilizando el modelo cinético de tejido de referencia simplificado (SRTM). El SRTM se basa en 2 asunciones: el volumen de distribución es el mismo en la región rica y el tejido de referencia y la cinética en el la región rica en el receptor es tal que es difícil distinguir entre la unión específica y la no específica.

El *binding potential* es un parámetro que mide la proporción entre la densidad del receptor y el ligando libre en el equilibrio. Para el cálculo del *binding potential* se seleccionó el hipocampo como región rica en receptor 5-HT_{1A} y el cerebelo como la región de referencia. El binding potential se corresponde con la siguiente ecuación:

$$BP = \frac{B_{max}}{Kd}$$

donde B_{max} es la densidad del receptor y K_D la constante de disociación del radiotrazador en el equilibrio.

Posteriormente, estos mapas paramétricos se analizaron por VOIs y se compararon los diferentes *binding potential* de los grupos experimentales respecto a su control con un test T de Student y se consideró que había diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de p era menor de 0,05.

Estos estudios no se realizaron en los grupos tratados con 8-OH-DPAT, ya que este agonista de 5-HT_{1A} desplaza al radioligando y no se obtienen datos de captación.

Protocolo de PTZ agudo

Como en los estudios con ¹⁸F-FDG, se hicieron 2 estudios en cada animal, uno control con salino y otro con PTZ.

Para ello, se inyectó intraperitonealmente una dosis convulsiva de PTZ (70 mg/kg) o de salino, según correspondiera, y, posteriormente, se evaluó el nivel comportamental de la crisis de acuerdo con la escala de Lamberty (Lamberty y Klitgaard, 2000). Inmediatamente después de la crisis, se anestesió al animal con isoflurano (5%) para canular en vena caudal. Una vez canulado, se le posicionó en el escáner y se le administró la dosis de MPPF (400 µCi) a la vez que se iniciaba la adquisición.

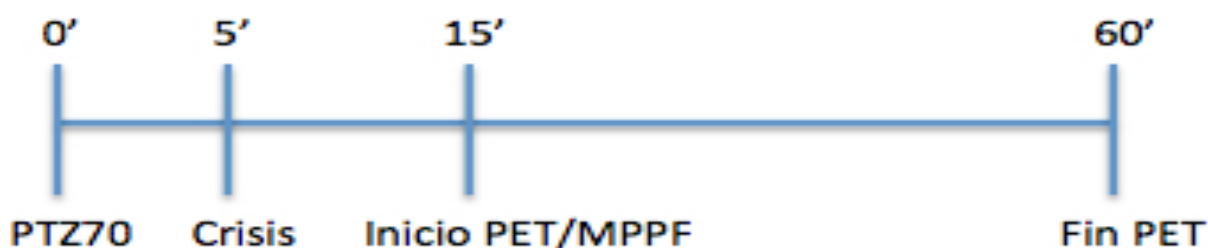


Figura 22. Representación cronológica del estudio de adquisición dinámica de la captación de ¹⁸F-MPPF para evaluar el efecto de la inyección de una dosis convulsiva de PTZ. Se administra PTZ con el animal despierto. Una vez terminada la crisis se anestesia al animal y se comienza la adquisición PET. Diez segundos después de comenzar el estudio se inyecta la dosis de ¹⁸F-MPPF.

3.8.3 Imágenes Resonancia Magnética

Los estudios de imagen por resonancia magnética se realizaron en el CAI de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Complutense de Madrid antes de comenzar el protocolo de kindling. La tomografía de resonancia magnética fue adquirida en un escáner BIOSPEC BMT 47/40 (Bruker,

Ettlingen, Alemania) operando a 4,7 T y equipado con un sistema de gradiente de 12-cm activamente protegido.

Las ratas se anestesiaron con la misma mezcla de oxígeno e isoflurano, y, posteriormente, se colocaron en una posición prona en el interior de un cabezal de sonda de 7-cm de radiofrecuencia con su cabeza mantenida en una posición fija. Se utilizó un sensor de respiración para controlar los animales durante el procedimiento de exploración. Se realizó un ajuste global, seguido de tres imágenes rápidas scouts spin-eco en las direcciones axiales, sagitales y coronales para localizar el cerebro. Los parámetros de adquisición de estas adquisiciones fueron: tiempo de repetición (TR) = 2100 ms, tiempo de eco efectiva (TE) = 60 ms, FOV = 3,6 × 3,6 cm² y el tamaño de la matriz = 256 × 128. Los datos adquiridos se rellenan con ceros para obtener imágenes de 256 × 256 píxeles. El tiempo de adquisición para cada experimento fue de 33 s. Un estudio spin-echo 3-D rápido se realizó mediante los siguientes parámetros de adquisición: TR = 1600 ms, TE efectiva = 80 ms, FOV = 3,5 × 3,5 × 3,5 cm³ y tamaño de la matriz = 128 × 128 × 64. El tamaño de la matriz reconstruida fue de 128 × 128 × 128 píxeles y el tamaño fue de 0,27 × 0,27 × 0,27 mm. El tiempo total de adquisición para este experimento fue 14 min.

3.9 Estudios autorradiográficos

Una vez finalizados los protocolos de epileptogénesis los animales fueron sacrificados. A los animales de kindling químico con PTZ y kindling eléctrico se les extrajo el cerebro y se seccionó en un criostato para, posteriormente, realizar diferentes estudios autorradiográficos.

3.9.1 Autorradiografía *ex vivo* de 18F-FDG

Una vez finalizado el kindling, los animales eran decapitados 30 minutos después de la inyección por vía intravenosa de FDG (1,5 mCi). Posteriormente,

se retiraba el electrodo y se extraía el cerebro y se sumergía en isopentano frío para congelar inmediatamente el órgano.

Los cerebros fueron seccionados en el criostato a -20°C y con un espesor de 40 µm, desde el bulbo olfatorio hasta el cerebelo. Los cortes se dividieron en 5 series en otros tantos portaobjetos de manera alterna, habiendo así una distancia real de 200 µm entre un corte y el siguiente de cada portaobjetos.

Una de las series fue inmediatamente expuesta a una película fotográfica y el resto de series guardadas en el congelador -80°C. Tras 2 horas de exposición la película era revelada manualmente.

Una vez terminado el revelado, la película se lavó con agua destilada y se secó. La película ya seca se digitalizó con ayuda de una lupa (Leica MZ6) con una cámara acoplada (Leica DFC425) conectada a un PC. Para la toma de fotografías y su almacenamiento se utilizó el software Leica Application Suite V3 (Leica Geosystems, España).

El análisis de las autorradiografías se hizo por VOIs. Para ello, se invirtió el color de las imágenes obtenidas con la lupa con ayuda del software ImageJ. Posteriormente, se cargaron todas las imágenes de un mismo cerebro en orden en PMOD y se corrigió cada corte con su anterior y su posterior obteniendo una imagen tridimensional del cerebro. Esa imagen se normalizó a la imagen de resonancia magnética de ese mismo cerebro y se analizó con el mapa de VOIs trazados sobre esa misma resonancia.

Cuando se hubo corregido y obtenido los valores de cada VOI para todos los cerebros, se dividieron en los grupos experimentales y se compararon al control con el test estadístico T de Student. Se consideró que había diferencia significativa estadísticamente cuando el valor de p era inferior a 0,05.

3.9.2 Autorradiografía in vitro de 18F-MPPF

En días posteriores al sacrificio de los animales, se descongelaron las series utilizadas para la autorradiografía de FDG para realizar la autorradiografía de MPPF.

Los cortes fueron fijados en la estufa a 37°C y preincubados en tris-HCl 50mM con pH 7,4 a temperatura ambiente durante 5 minutos. Tras ese tiempo, los cortes se incubaron en la misma solución con 18F-MPPF en una concentración de 1 µCi/ml durante 20 minutos a temperatura ambiente. El lavado se realizó con 2 *dips* en agua destilada a 4°C.

Posteriormente, los portaobjetos fueron secados en la estufa a 37°C y expuestos a una película fotográfica. Tras una hora de exposición, la película fue revelada manualmente.

El análisis de las autorradiografías se hizo por VOIs. Para ello, se invirtió el color de las imágenes obtenidas con la lupa con ayuda del software ImageJ. Posteriormente, se cargaron todas las imágenes de un mismo cerebro en orden anteroposterior en PMOD y se corregistró cada corte con su anterior y su posterior obteniendo una imagen tridimensional del cerebro.

En este caso, los cerebros no fueron corregistrados a su resonancia, si no que se dibujo los VOIs directamente sobre la imagen volumétrica de autorradiografía solamente en las zonas ricas en el receptor 5-HT_{1A} y en la estructura de referencia, el cerebelo.

Cuando se hubo obtenido los valores de cada VOI para todos los cerebros, se clasificaron según los grupos experimentales y se compararon al control con el test estadístico t de Student. Se consideró que había diferencia significativa estadísticamente cuando el valor de p era inferior a 0,05.

3.9.3 Autorradiografías con ligandos tritiados

Para el estudio de la unión de ligandos tritiados se utilizaron los cortes realizados en el día de sacrificio de los animales de 40 µm de espesor. En el caso de estos ligandos no se realizó la autorradiografía en todos los cortes seriados del cerebro, únicamente se incubaron cortes en los que estaban las estructuras específicas.

Puesto que en los dos protocolos de kindling, la forma de administrar el estímulo es diferente, también se analizaron de modo diferente. En el caso del kindling químico el estímulo fue administrado de forma sistémica, por lo tanto, no se distinguió entre las partes de cada hemisferio de las estructuras cerebrales, considerándolas una sola estructura.

Sin embargo, en los animales de kindling eléctrico el electrodo estaba implantado en el hemisferio izquierdo, por lo que sí podía haber diferencias interhemisféricas. En el análisis de las autorradiografías con ligandos tritiado de estos animales sí se dividió en los dos hemisferios las estructuras cerebrales en las que esto era posible.

Autorradiografía 3H-AMPA

Para el marcaje de los receptores glutamatérgicos de tipo AMPA, se utilizó el ligando tritiado 3H-AMPA (Perkin Elmer, EEUU). Antes de la incubación con el ligando se procedió a una preincubación de los cortes con tiocianato potásico 100mM disuelto en Tris-acetato 50mM con un pH de 7,2 a 4°C. La preincubación se repitió 3 veces durante 10 minutos cada una de ellas. Tras la preincubación, se realizó la incubación de los cortes con la misma solución añadiendo el ligando tritiado en una concentración de 10nM durante 45 minutos a 4°C. Después de esos 45 minutos se realiza el lavado 4 veces en el buffer de incubación sin el ligando tritiado durante 4 segundos y, posteriormente, 2 veces en una solución de glutaraldehído en acetona al 2,5% durante 2 segundos.

Después del marcaje, los cortes se secaron en la estufa a 37°C y se dispusieron en los cassettes junto con una película fotográfica de alta resolución durante 10 semanas. Tras ese tiempo, se revelaron las películas fotográficas de forma manual.

Autorradiografía 3H-MK801

Este ligando se une a los receptores glutamatérgicos tipo NMDA. Para ello se preincubaron los cortes coronales en Tris clorhídrico 50mM con glutamato 50 M, glicina 30 M y espermidina 50 M con un pH de 7,2 a 4°C. Después de la preincubación, los cortes se sumergieron en la solución de incubación (50 M de glutamato, 30 M de glicina y 50 M de espermidina en Tris clorhídrico 50mM a un pH de 7,2) con el ligando a 3,3 nM durante una hora a temperatura ambiente. Tras la incubación, se lavaron los cortes con la solución de incubación sin glutamato 2 veces durante 5 minutos cada lavado y, finalmente, con agua destilada a 4°C durante 1 segundo.

Una vez finalizado el protocolo los portas se secaron en la estufa a 37°C y se expusieron a una película fotográfica de alta resolución durante 10 semanas antes de proceder al revelado.

Autorradiografía 3H-Kainate

El ligando 3H-kainate se une a los receptores glutamatérgicos de kainato. Los cortes se preincubaron en una solución de Tris citrato 50 mM y acetato cálcico 10 mM a un pH de 7,1 a 4°C. La preincubación se repitió 3 veces durante 10 minutos cada repetición. Tras ese tiempo se incubaron los cortes en esa misma solución, esta vez con el ligando radiactivo a una concentración de 9,4 nM durante 45 minutos a 4°C de temperatura. Una vez finalizada la incubación, se realizó el lavado en el buffer de incubación sin ligando 3 veces durante 4

segundos a 4°C y otras 2 veces con glutaraldehído en acetona al 2,5% durante 2 segundos cada una de ellas.

Tras el protocolo de incubación, los portaobjetos se secaron en la estufa a 37°C. Una vez secos se pusieron en un *cassette* junto con una película fotográfica de alta resolución. Tras 12 semanas de exposición, la película fue revelada de forma manual.

Autorradiografía 3H-Paroxetina

El ligando 3H-Paroxetina se utiliza para marcar el transportador de serotonina. Se preincubaron los portas con las secciones de cerebro en una solución de tris-clorhídrico 50mM a un pH de 7,4 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron en esa misma solución con cloruro sódico a 120mM y cloruro potásico a 5mM, además del ligando tritiado en una concentración de 0.5nM, durante 60 minutos a temperatura ambiente. Una vez terminada la incubación se lavaron los cortes sumergiéndolos 2 veces durante 20 minutos en el buffer de incubación sin el ligando tritiado y, después, 2 *dips* en agua a 4°C.

Una vez finalizado el marcaje los portas se secaron en la estufa a 37°C y se expusieron a una película fotográfica de alta resolución durante 14 semanas antes de proceder al revelado.

Autorradiografía 3H-Flumazenilo

La autorradiografía con 3H-Flumazenilo marca los receptores de benzodiazepinas. Los cortes de cerebro se preincubaron en Tris clorhídrico 50mM a un pH de 7,9 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron en ese mismo buffer añadiéndole el ligando (RO15-1788) a una concentración de 2nM durante 60 minutos a 4°C. Tras la

incubación se realizó el lavado de los portas sumergiéndolos 2 veces durante 2 minutos en la solución de preincubación a 4°C durante 2 minutos y un *dip* en agua destilada también a 4°C.

Después del lavado, se secaron los portas en la estufa a 37°C y se colocaron en un cassette. Los cortes se expusieron a películas fotográficas de alta resolución durante 4 semanas, tras las cuales se procedió a revelarlas.

Revelado de las películas de ligandos tritiados

Todas las película de los ligandos de tritio se revelaron de forma manual siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

- 5 minutos en revelador
- 2 minutos en agua
- 5 minutos en fijador

Una vez reveladas las películas se digitalizaron los cortes con ayuda de una cámara Leica acoplada a una lupa binocular y conectada a un PC. Posteriormente, las imágenes se analizaron por regiones con ayuda del software ImageJ. La captación del ligando se cuantificó por los valores en la escala blanco/negro que se obtiene una vez invertido el color de la imagen. Cuando se obtuvieron todos los valores se analizó si había diferencia entre ambos grupos mediante el test estadístico t de Student y consideramos que había diferencia significativa cuando el valor de p era inferior a 0,05.

3.9.4 Estudios de marcaje con fluoróforos

Marcaje con Fluor Jade y DAPI

El DAPI se une al ADN de las células, marcando así todas las células de la preparación con una fluorescencia azul. El fluor Jade marca neurodegeneración con una fluorescencia verde. Con el doble marcaje conseguimos ver todas las células del corte seleccionado en azul y en verde las neuronas que están degenerando. Además, puesto que el DAPI se une al núcleo de las células, se puede ver la morfología de este, que en caso de ser irregular también es un marcador de degeneración.

Para el marcaje seguimos el siguiente protocolo:

1. Fijación: 4% formaldehído en buffer fosfato 0.1 M pH 7.4, durante 10 min.
2. Lavado: 2 veces en buffer fosfato.
3. Alcohol básico (NaOH 1% en etanol 80%) 5 min.
4. Etanol 70% 2 min
5. Agua destilada 2 min.
6. Permanganato potásico 0,06% 10 min.
7. Agua destilada 90 segundos.
8. Fluoro Jade C 0,0001% en ácido acético 0,1% 10 min. Para ello se hace una solución stock 0,01% en agua destilada. Para hacer un doble marcaje con DAPI, se añade 0,0001% de DAPI a la solución de trabajo de Fluoro Jade C. Para ello se hace una solución stock de DAPI 0,01% y se añade 1 ml de esta solución junto con 1 ml de la solución stock de

Fluoro Jade C 0,01% y 98 ml de ácido acético 0,1%. Esta solución de trabajo una vez preparada debe usarse antes de 2 horas.

9. Agua destilada 3 veces durante 1 min.
10. El exceso de agua es retirada por papel y los portas se secan con aire a 50°C durante al menos 5 min.
11. A continuación se aclaran en xileno durante 1 min.
12. Se cubre con medio de montaje DPX.

Las secciones se examinaron al microscopio de epifluorescencia usando un sistema de filtros para fluoresceína (Excitación 385 nm; Emisión 425 nm). Para observar el marcaje nuclear azul por DAPI se utilizó luz UV.

Estudios de inmunofluorescencia con GFAP

Para observar la respuesta de la glía a nuestros modelos de epileptogénesis y ver si ésta era diferente entre ambos tipos de kindling realizamos estudios de inmunofluorescencia con GFAP, que marca las células de la glía. Para ello utilizamos los cortes obtenidos anteriormente y que estaban mantenidos en el congelador a -80°C. Una vez atemperados estos cortes, seguimos el siguiente protocolo:

1. Fijamos los cortes con acetona “ice cold” durante 5 minutos y, posteriormente, dejamos secar al aire.
2. Lavamos con TBS durante 30 minutos.
3. Bloqueamos incubando las secciones con TBS con BSA al 3% y tritón X-100 al 0,1% durante una hora.
4. Incubamos los cortes con el anticuerpo para GFAP (Sigma-Aldrich) en una dilución 1:500 en TBS con BSA al 1% a 4°C en cámara húmeda durante toda la noche.
5. Lavamos 3 veces con TBS con Tween 20 al 0,1% durante 5 minutos.

6. Marcamos los núcleos con una solución de DAPI en TBS durante 10 minutos.
7. Lavamos con TBS 3 veces durante 5 minutos.
8. Cubrimos los cortes con solución acuosa de montaje y un cubreobjetos.

Para la visualización de estos cortes se examinaron al microscopio de epifluorescencia usando un sistema de filtros para fluoresceína (Excitación 550 nm; Emisión 570 nm). Para observar el marcaje nuclear azul por DAPI se excitó la muestra con luz UV.

En el caso de las tinciones con fluoróforos, no se cuantificó el marcaje de estas moléculas en las secciones de cerebro seleccionadas. El análisis de estas pruebas fue cualitativo, calificando los resultados como positivo o negativo únicamente.

3.10 Reactivos empleados

3.10.1 Estudios in vitro

Todos los reactivos utilizados en los estudios autorradiográficos *in vitro*, a excepción del fluorojade (Milipore, Billerica, EEUU), se adquirieron en Sigma-Aldrich (SigmaAldrich Química,S.A. Barcelona, España), incluyendo el anticuerpo anti-GFAP, y el fluoróforo marcador de núcleos DAPI.

3.10.2 Fármacos

Para la realización de la cirugía se utilizaron diferentes fármacos, tanto para la anestesia del animal como para su recuperación tras el procedimiento. Además, también se utilizaron fármacos en el tratamiento de potenciación del sistema serotoninérgico y para la inducción de epileptogénesis en los modelos químicos. En la siguiente tabla se detallan tanto su efecto farmacológico como su procedencia:

Fármaco	Nombre comercial	Efecto farmacológico	Procedencia
8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralin	8-OH-DPAT	Agonista 5-HT _{1A}	Sigma-Aldrich
Carprofeno	Rimadyl	Antiinflamatorio-analgésico	Pfizer
Enrofloxacino	Baytril	Antibiótico	Bayer
Enrofloxacino	Hipralona Enro	Antibiótico	Hipra
Pentilentetrazol	PTZ	Agonista GABA _A	Sigma-Aldrich
1-cloro-2,2,2-trifluoroetil difluorometil éter	Isoflurano	Anestésico inhalatorio	Esteve Veterinaria

4. Resultados

4.1 MODELO DE PTZ AGUDO

4.1.1 *Electrofisiología*

La totalidad de los animales alcanzó crisis convulsivas tras la administración de dosis acumulativas de PTZ ($n = 8$). En el registro extracelular en CA1 de hipocampo, se observa las descargas epileptiformes coincidiendo con la crisis convulsivas (nivel 4 ó 5 de la escala comportamental) con un acumulado de 70 mg/kg.

En estos registros se observó una correlación de la actividad eléctrica en el hipocampo con el comportamiento del animal. No se observaron cambios en el registro cuando los animales alcanzaban el nivel 0 y 1 de la escala comportamental. Cuando los animales sufrían espasmos (nivel 2) se observaban puntas aisladas en el registro. El estadio 3 se caracteriza por tener espigas continuas y ondas complejas de gran amplitud cuya frecuencia fluctúa entre los 10 y 12 Hz (figura 23). Durante este estadio el animal sufría tirones mioclónicos y se levantaba sobre sus patas traseras adquiriendo la “postura de canguro”, típica de este protocolo y que suele anteceder a una crisis clónica.

Cuando el animal evolucionaba a una crisis clónica o tónico-clónica (estadio 4 ó 5), el registro eléctrico reflejaba anormalidades en el trazo con ondas complejas y espigas continuas que fluctuaban entre los 20-30 Hz. Una vez finalizada la crisis, el registro mostraba una depresión postictal, en la que la actividad eléctrica era menor que la actividad basal (figura 23).

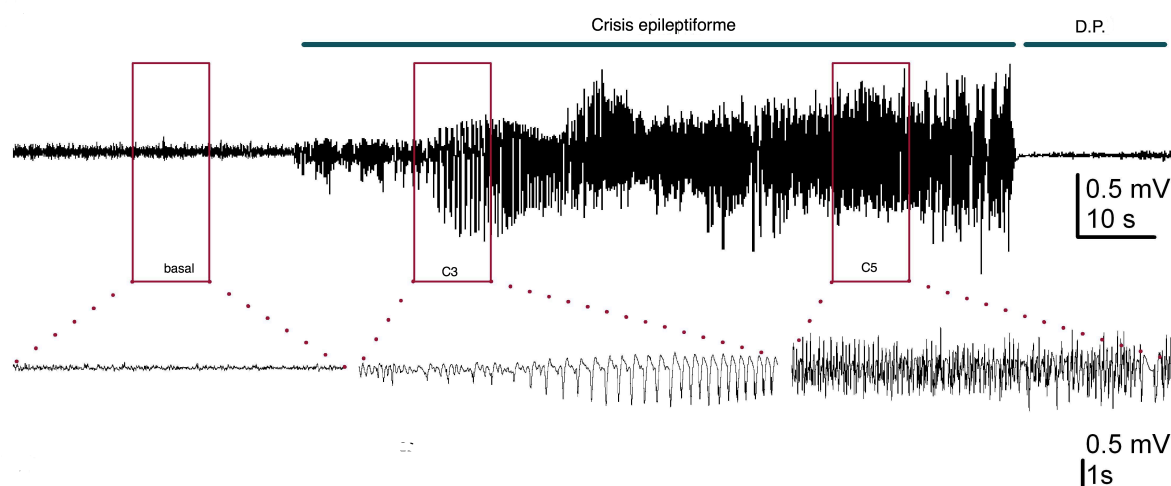


Figura 23. Registro eléctrico de la región CA1 del hipocampo durante una crisis convulsiva provocada por la administración de PTZ. Se observa las diferencias de las descargas durante la crisis respecto a la actividad basal. Al principio de la crisis se distinguen unas descargas de baja frecuencia que se corresponden con el nivel 3 de la escala comportamental. Posteriormente se observan unas descargas de mayor amplitud y mayor frecuencia que se corresponden con la fase clónica de la crisis.

La administración de un acumulado de 70mg/kg en estos animales les indujo un promedio de 4 crisis convulsivas durante los 60 minutos de registro. Estas crisis epileptiformes tenían una duración media de 104 ± 5 segundos. Todos los animales sufrieron al menos una crisis tónico-clónica en este experimento.

El umbral de descarga no cambió con el tratamiento con una dosis de 1mg/kg de 8-OH-DPAT (i.p.). Sin embargo, únicamente el 75% de animales de este grupo ($n = 8$) sufrió una crisis convulsiva. De forma similar, redujo la duración media de estas crisis a la mitad de tiempo que en el grupo sin pretratamiento (68 segundos frente a 104,63 segundos de promedio), siendo estadísticamente significativo ($p = 0,0329$).

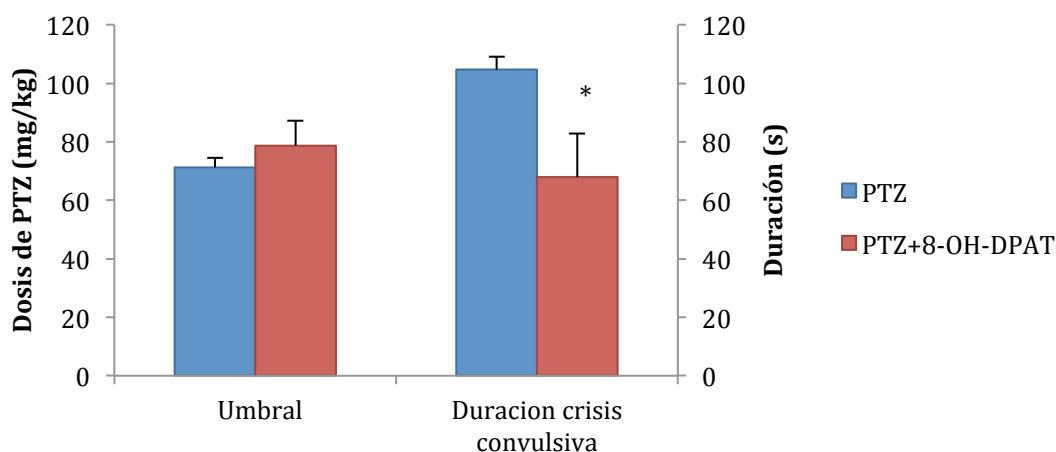


Figura 24. Gráfico del umbral promedio en el que los animales sufrían una crisis convulsivas y la duración media de estas crisis convulsivas en los animales de ambos grupos experimentales, con y sin pretratamiento con el agonista de 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT. Se observan diferencias en la duración, siendo estadísticamente significativo el descenso de la duración de las crisis en los animales pretratados con el agonista de serotonina. *P<0,05

Además, el 8-OH-DPAT redujo el número de crisis promedio que sufrían los animales durante el protocolo, pasando de 4 crisis en los animales controles durante la hora de registro a un promedio de 0,75 crisis cada animal. Esta reducción fue estadísticamente significativa ($p = 0,0003$).

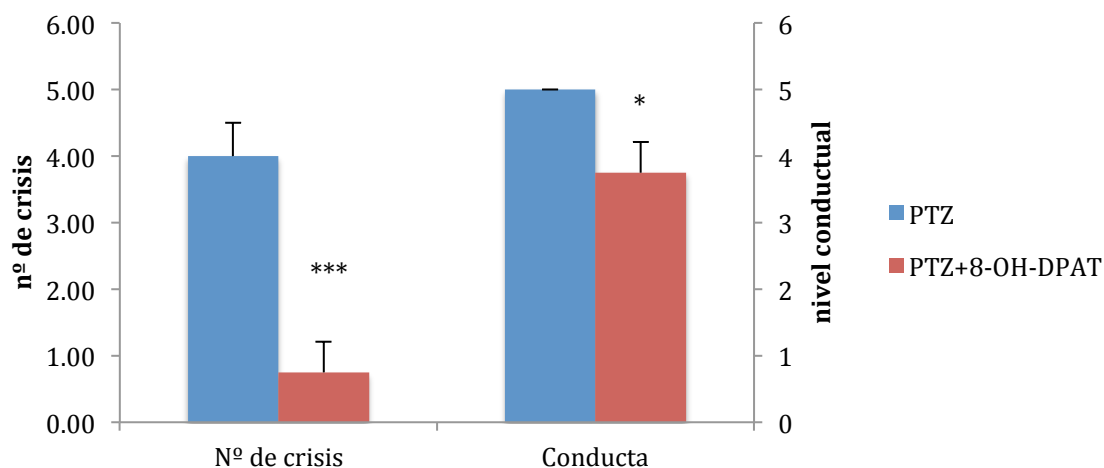


Figura 25. Representación en gráfico de barras del promedio de número de crisis sufrido por los sujetos de cada grupo y el nivel comportamental máximo alcanzado. Se observan diferencias entre ambos grupos tanto en el número de crisis como en el nivel comportamental. El número de crisis se reduce notablemente en los animales pretratados con 8-OH-DPAT, siendo esta disminución estadísticamente significativa. También se redujo el nivel máximo alcanzado en la escala comportamental. *P<0,05; ***P<0,001

A nivel comportamental también se observaron diferencias entre los dos grupos experimentales. En el grupo al que únicamente se le administró PTZ todos los animales alcanzaron el máximo nivel de la escala comportamental en al menos una de las crisis sufridas, mientras que en el grupo de animales pretratados con 8-OH-DPAT ningún animal sufrió una crisis tónico-clónica, siendo el nivel 4 de la escala comportamental el máximo alcanzado por 6 de los 8 animales de este grupo experimental. El promedio del nivel máximo alcanzado en esta escala en el grupo al que se le administró el agonista de 5-HT_{1A} fue de 3,75, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,0167$).

4.1.2 Estudios PET

Estudios PET con 18F-FDG

ESTÁTICOS

Tras la inyección de salino en el grupo control ($n = 10$) y de PTZ ($n = 8$) en el grupo PTZ se obtuvieron las imágenes PET. En este experimento se puede observar un claro descenso de la captación de 18F-FDG tras el protocolo de PTZ comparando con la captación de esos mismos animales en el protocolo control con salino. La disminución de la captación de FDG fue generalizada en todo el cerebro, disminuyendo una media del 30% respecto al grupo control. En las imágenes PET se puede observar como el grupo control tiene una mayor captación de 18F-FDG que el grupo PTZ (Figura 26).

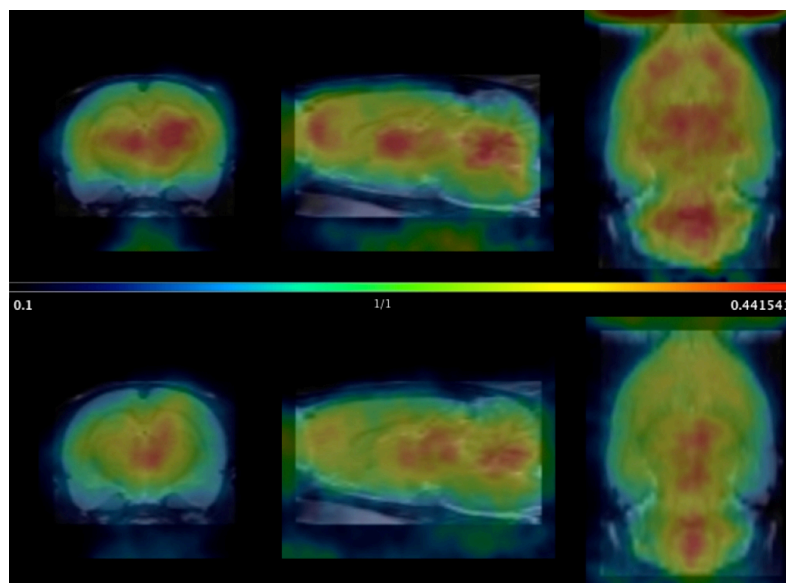


Figura 26. Comparativa de las imágenes PET obtenidas en ambos grupos. El grupo control (superior) muestra una mayor captación de 18F-FDG que el grupo al que se le administró una dosis de 70 mg/kg de PTZ (inferior).

El análisis por VOIs de las imágenes PET tras la administración de 18-FDG en animales, primero con una inyección de salino (grupo control) y, posteriormente, inyectándoles una dosis de 70 mg/Kg de PTZ (grupo PTZ), muestran un descenso de la actividad metabólica generalizado en todas las estructuras cerebrales como consecuencia de la actividad del PTZ. Tras normalizar la actividad de cada VOI a la actividad del cerebelo de cada animal se observan diferencias estadísticamente significativas en estriado ($p = 0,0039$), tálamo ($p = 0,002$) e hipocampo ($p = 0,014$).

Al analizar las estructuras por hemisferios no se observaron diferencias entre izquierda y derecha.

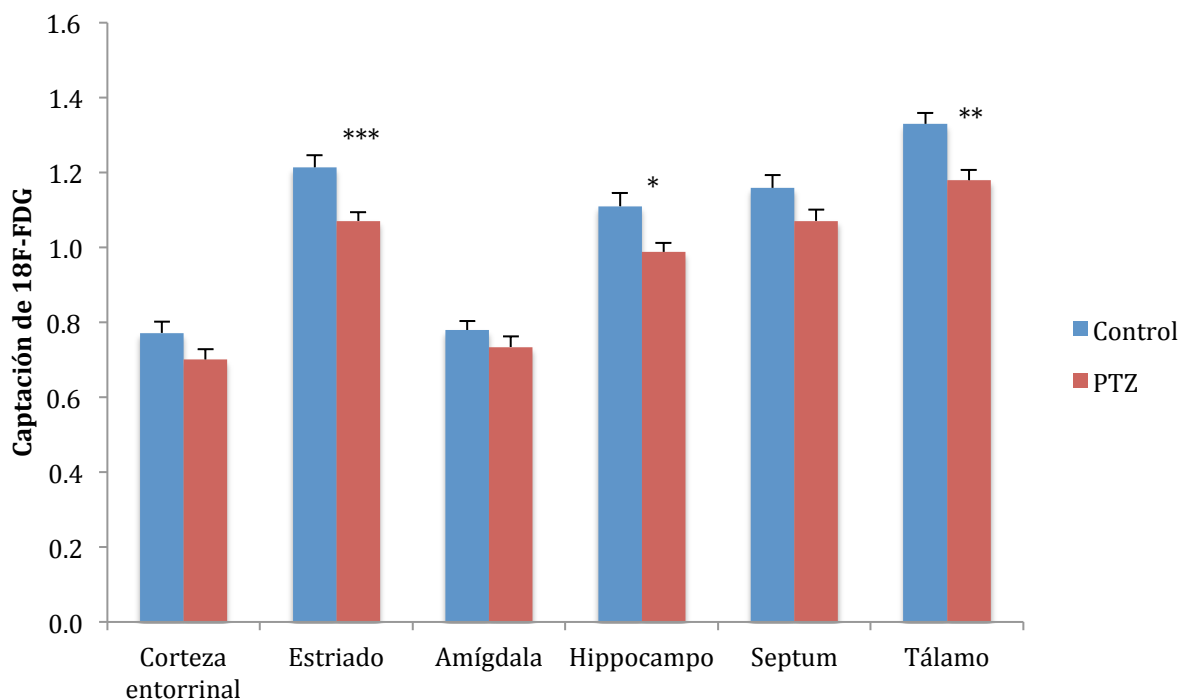


Figura 27. Comparativa de la captación de 18F-FDG de las estructuras normalizadas a cerebelo. Se ve un hipometabolismo generalizado en los animales tratados con PTZ (70mg/kg). Las diferencias son estadísticamente significativas en estriado, hipocampo, septum y tálamo. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

DINÁMICOS

Igual que en el experimento anterior, se realizó un escáner en los animales con salino (n = 4) y, posteriormente, se les realizó el mismo estudio tras administrarles una dosis de 70 mg/kg de PTZ (n = 4). Sin embargo, en este caso, los animales estaban anestesiados en el momento de la administración del fármaco, por lo que no hubo evaluación comportamental. Sin embargo se realizó un registro de la actividad neuronal en la corteza motora durante toda la adquisición PET. En este registro se pudo observar puntas epileptiformes en los animales a los que se les había administrado el fármaco y que no aparecían en el protocolo con salino.

Al ser un estudio dinámico no se analizaron las imágenes promediadas del estudio. En este caso se compararon las constantes K_i , que representa el flujo total de la FDG hacia el interior de la célula (Castell y Cook, 2008):

$$K_i = \frac{(K_1 \times K_3)}{(K_2 + K_3)}$$

Como se puede observar en la siguiente gráfica (Figura 28), la velocidad de entrada de glucosa en la célula fue superior en el grupo tratado con PTZ. Este aumento es notable en todas las estructuras cerebrales, sin embargo, únicamente es significativo estadísticamente en el estriado ($p = 0,0209$).

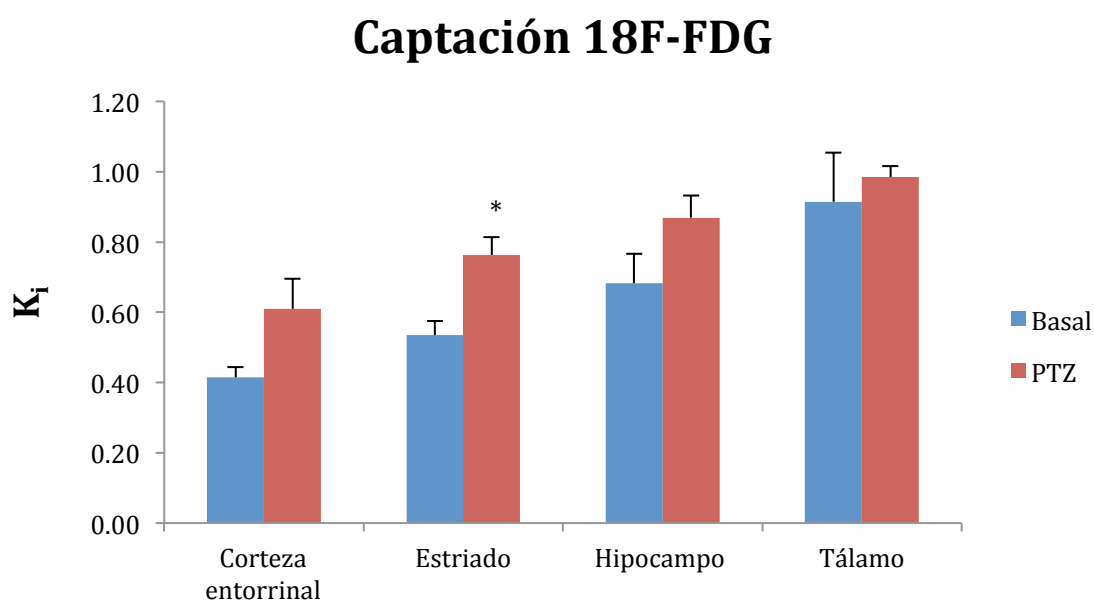


Figura 28. Comparativa de la constante K_i entre el grupo con salino ($n=3$) y los animales con 70mg/kg de PTZ ($n=4$). Se observa una tendencia al aumento del flujo de FDG hacia el interior de las células en los animales tratados con PTZ. Este aumento únicamente es significativo en estriado ($p = 0,0209$). * $P < 0,05$

Estudios PET con 18F-MPPF

En los estudios con 18F-MPPF tomamos el *binding potential* como variable para saber si el sistema serotoninérgico era alterado por las crisis con PTZ. En los animales basales (n = 5) obtuvimos valores de *binding potential* entre 0,4 y 0,9 en las regiones ricas en este receptor, mientras que en el cerebelo el valor fue de entre 0,05 y 0,09.

Al comparar estos controles con los animales a los que se les inyectó PTZ (n = 5) pudimos observar un aumento del *binding potential* en el grupo de PTZ. Este aumento se da en varias estructuras cerebrales pero no es generalizado. El *binding potential* es estadísticamente significativo en amígdala (p = 0,0053), estriado (p = 0,0406), e hipocampo (p = 0,0171). En otras estructuras se observó una tendencia de aumento del *binding potential* de este radiotrazador sin llegar a ser estadísticamente significativo como, por ejemplo, el tálamo (p = 0,0682).

	Control	PTZ
Corteza entorrinal	0.39 ± 0.04	0.48 ± 0.03
Estriado	0.34 ± 0.03	0.41 ± 0.01*
Septum	0.65 ± 0.05	0.65 ± 0.05
Amígdala	0.40 ± 0.05	0.58 ± 0.03**
Hipocampo	0.78 ± 0.09	1.02 ± 0.07*
Cerebelo	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01

Figura 29. Tabla que muestra los valores del *binding potential* del radiotrazados 18F-MPPF en diferentes estructuras cerebrales de ambos grupos experimentales. Se observa un aumento de la captación del MPPF en los animales con PTZ. Este aumento es estadísticamente significativo en amígdala, hipocampo y estriado. *P<0,05; **P<0,01

En los estudios autorradiográficos con este trazador se observó un aumento de la densidad del receptor 5-HT_{1A} en los animales a los que se les administró PTZ respecto al grupo control ($p = 0,0328$).

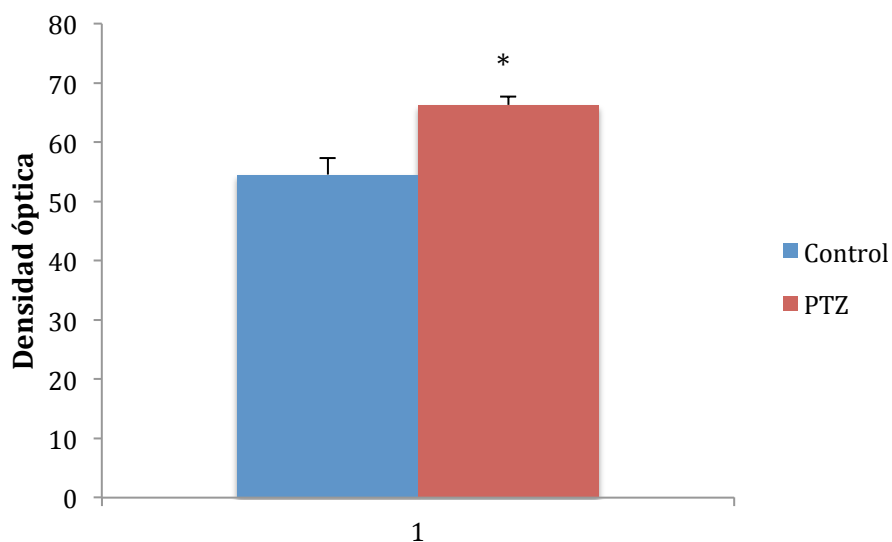


Figura 30. Representación en gráfico de barras de la densidad de receptor 5-HT_{1A} en el giro dentado de hipocampo dorsal. Se observa una mayor unión del trazador 18F-MPPF en los animales de PTZ respecto a los animales controles. * $P < 0,05$

4.2 MODELO KINDLING QUÍMICO

Tras 18 sesiones de kindling químico con PTZ (n = 12) no todos los animales alcanzaron el nivel comportamental 4 ó 5 en la escala comportamental. A los animales que no lo hicieron en 3 días consecutivos se les consideró kindling negativo. El 50% de los animales tratados con PTZ alcanzaron el kindling, mientras que el 50% restante no sufrió crisis convulsivas en 3 sesiones consecutivas.

El porcentaje de éxito del kindling se redujo notablemente cuando los animales eran pretratados con el agonista del receptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, 20 minutos antes de la administración del PTZ (n = 12). En este grupo experimental sólo el 33% de los animales alcanzaron el kindling y el 67% restante se consideró como kindling negativo.

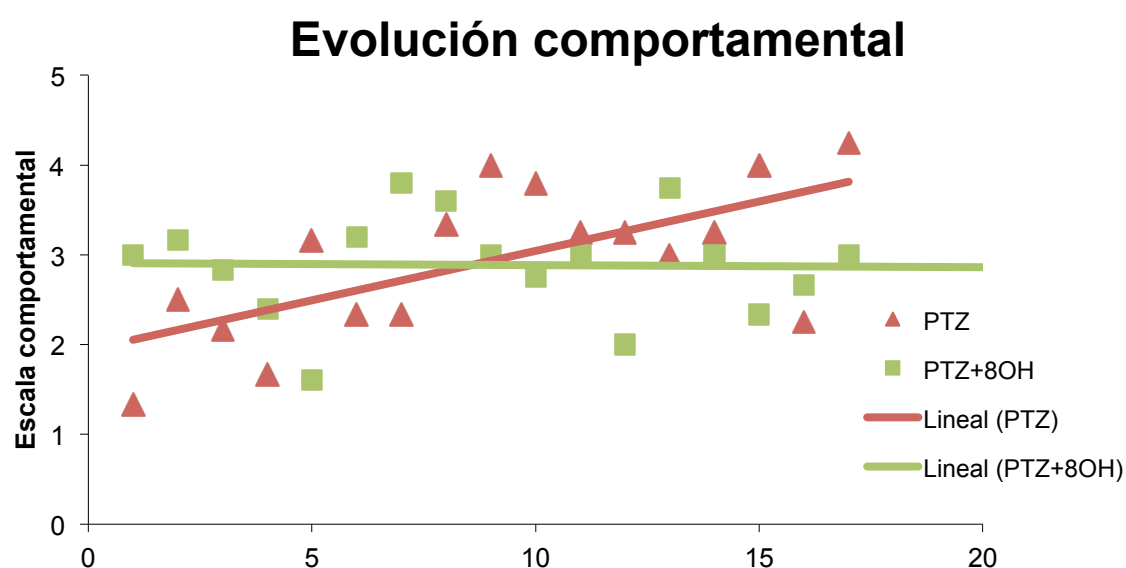


Figura 31. Evolución comportamental durante el kindling en los dos grupos experimentales tratados con dosis subconvulsivas de PTZ (35mg/kg). En las primeras sesiones el comportamiento entre ambos grupos es similar. Sin embargo, a partir de la octava sesión el grupo de PTZ sigue aumentando la media de l nivel comportamental mientras que el grupo de PTZ+8-OH-DPAT no aumenta excepto en la sesión 13, donde ambos grupos alcanzan un nivel similar.

El kindling químico puede provocar la muerte de los animales al sufrir un *status epilepticus*. Se considera que un animal ha entrado en *status epilepticus* cuando la crisis convulsiva se prolonga durante más de 20 minutos. En esos casos el animal muere debido a la duración de la crisis. En el grupo de PTZ, 2 animales sufrieron un *status epilepticus* y murieron, lo que supone una tasa de mortalidad del 16,6% en este grupo. En el grupo pretratado con 8-OH-DPAT este porcentaje se mantuvo en el 16,6%, sin que el pretratamiento con el agonista serotoninérgico tuviera ningún efecto en este aspecto del kindling.

4.2.1 Evolución peso

Al observar la evolución de los pesos en los 3 grupos experimentales (Figura 32) se aprecia que los grupos pretratados con el agonista del receptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, tanto el grupo al que se le administró PTZ como el grupo control con salino, aumentaban de peso mucho más lentamente que en el grupo de PTZ sin 8-OH-DPAT. La administración de PTZ y las posteriores crisis no afectaron al aumento de peso.

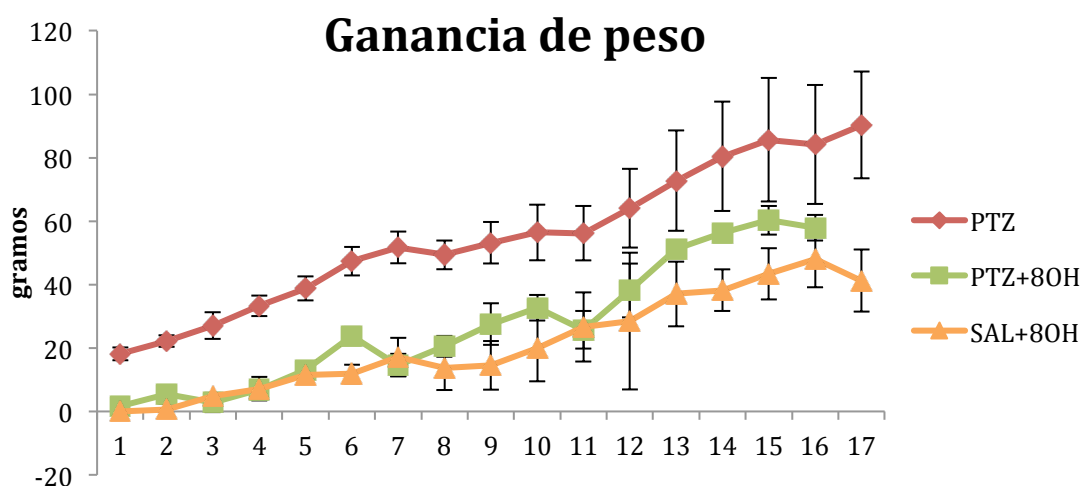


Figura 32. Representación gráfica de la evolución del aumento de peso medio en 3 grupos experimentales (PTZ, PTZ + 8-OH-DPAT y control + 8-OH-DPAT). Hay diferencias significativas en la evolución del peso entre los grupos con 8-OH y sin 8-OH durante los 11 primeros días de kindling (4 primeras semanas). No se observan diferencias en la evolución del peso entre los grupos de PTZ y salino.

Además, se observó que tras la administración del 8-OH-DPAT a los animales, tanto del grupo de salino como el de PTZ, éstos mostraban el comportamiento típico del síndrome serotoninérgico: movimientos faciales, arrastre de las extremidades posteriores e hiperlocomoción (Goodwin et al., 1987; Yamada et al., 1988; Wieland et al., 1989; Khan et al., 2001). Este comportamiento se observó durante todo el tratamiento con el agonista de 5-HT_{1A}.

4.2.2 Estudios de imagen PET

Estudios PET con 18F-FDG

Se realizaron estudios de la actividad metabólica cerebral mediante PET a todos los animales antes de comenzar el kindling, tras 5 sesiones y una vez finalizado el protocolo. El tamaño muestral fue similar en todos los grupos experimentales: 7 animales del grupo control, 8 del grupo de kindling químico, 7 ratas del grupo control con 8-OH-DPAT y 7 de kindling con 8-OH-DPAT.

Para poder comparar la captación de 18F-FDG de las diferentes estructuras cerebrales se normalizó la captación de todos los animales a una misma referencia. Se utilizaron 3 normalizaciones diferentes: por SUV (valor de captación estandarizado), por la actividad de la protuberancia y por la captación del cerebelo.

Descartamos la normalización a SUV debido a la gran variabilidad de los valores obtenidos en los grupos tratados con 8-OH-DPAT. Como se demostró anteriormente, este fármaco tiene efecto sobre el peso de los animales y,

puesto que el peso es uno de los factores del SUV, este valor no es correcto en este experimento.

Al normalizar la captación a la protuberancia obtuvimos un descenso de la captación de 18F-FDG generalizada en todas las estructuras cerebrales analizadas (figura 33).

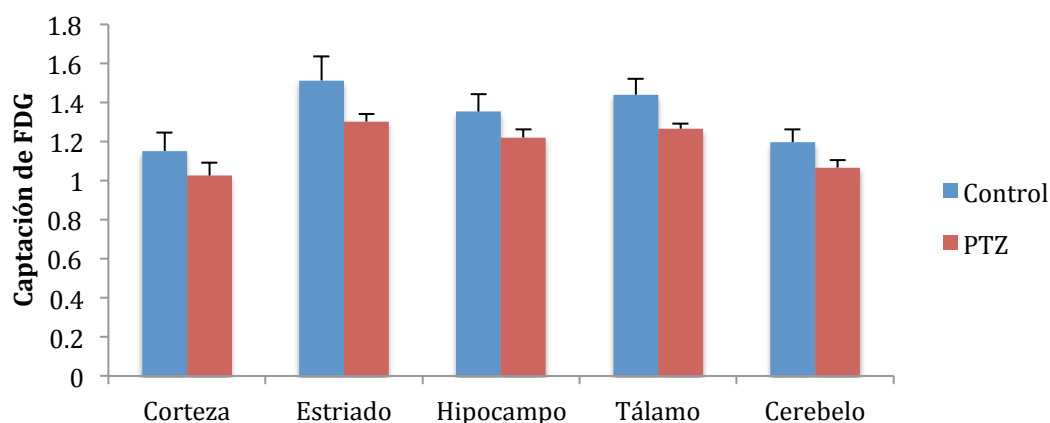


Figura 33. Gráfico de barras comparativo de la captación normalizada a protuberancia del grupo control frente al grupo de kindling químico con PTZ. Se observa un hipometabolismo generalizado en los animales del grupo de kindling.

También analizamos estos estudio con la normalización a cerebelo. Tras normalizar la captación de cada estructura a la actividad del cerebelo únicamente hubo diferencia significativa en la protuberancia en los animales del grupo de kindling químico respecto a los controles ($p = 0,0218$).

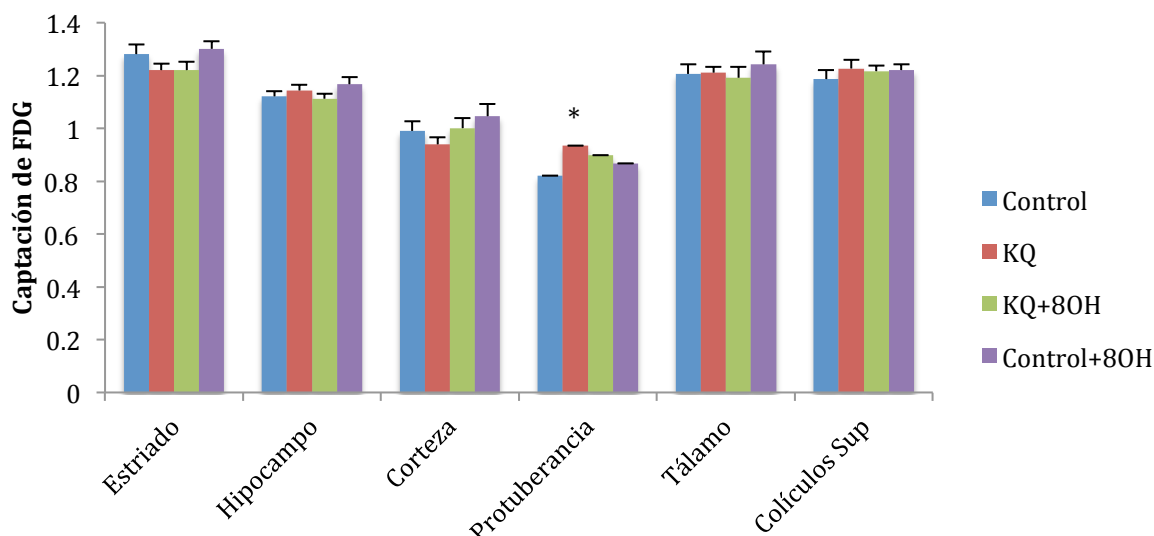


Figura 34. Comparativa de los 4 grupos experimentales de kindling con y sin 8OH-DPAT normalizado a la actividad del cerebelo. Únicamente aparece diferencia estadísticamente significativa en el protuberancia ($p = 0,0218$) entre el grupo de kindling químico y el grupo control. * $P < 0,05$

Al finalizar el protocolo dividimos el grupo Kindling en dos subgrupos: kindling positivo y kindling negativo; dependiendo si habían alcanzado crisis convulsivas en 3 sesiones consecutivas o no. El grupo control constaba de 7 animales, 5 animales kindling positivo y 3 negativos al kindling.

En el estudio PET únicamente se observó diferencia entre los animales control y los kindling en la protuberancia. Se detectó una tendencia al hipometabolismo en la corteza y el estriado, pero las diferencias no eran estadísticamente significativas. Sin embargo, al dividir el grupo de kindling en animales que alcanzaron las crisis convulsivas (kindling positivo) y los que no (kindling negativo), se observó un hipometabolismo en el grupo kindling positivo respecto a los animales que no alcanzaron kindling, que en este caso sí fue estadísticamente significativo ($p = 0,037$).

	Control	Kindling +	Kindling -
Corteza	0.96 ± 0.04	0.86 ± 0.02	1.03 ± 0.01 [#]
Estriado	1.26 ± 0.04	1.17 ± 0.01	1.26 ± 0.06
Hipocampo	1.13 ± 0.02	1.08 ± 0.01	1.19 ± 0.04
Protuberancia	0.84 ± 0.05	0.96 ± 0.01*	0.93 ± 0.05

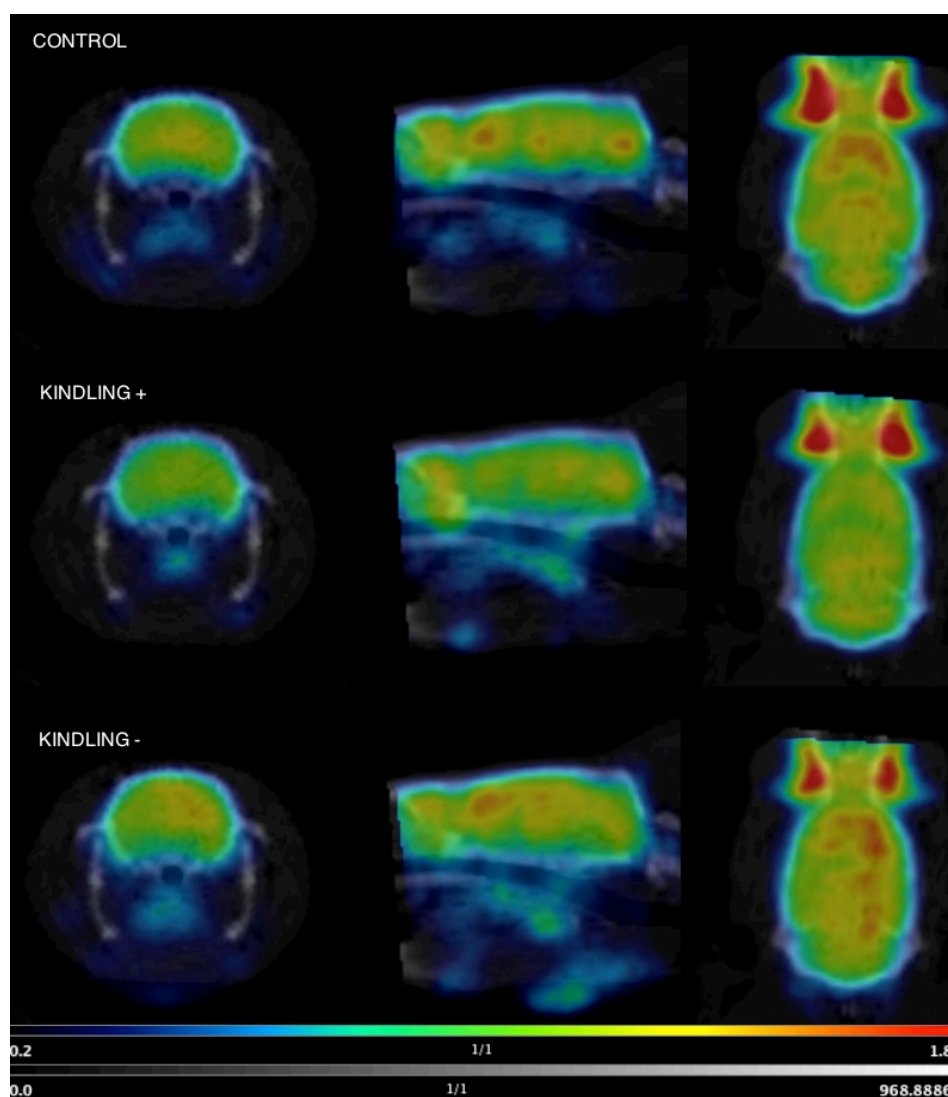


Figura 35. Tabla comparativa de la captación de 18F-FDG en las estructuras normalizadas a cerebelo. El grupo de kindling se ha dividido en dos subgrupos: animales que llegaron a kindling (KQ+) y animales que no alcanzaron el estadio 5 (KQ-). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en protuberancia en los animales de kindling respecto al grupo control . Además, se encontró una menor captación en corteza de los animales kindling positivo frente a los animales kindling negativo (#; p = 0,037). En las imágenes PET normalizadas a cerebelo se puede observar que la captación en corteza de los animales kindling positivo es visiblemente inferior a la captación de los otros dos grupos.

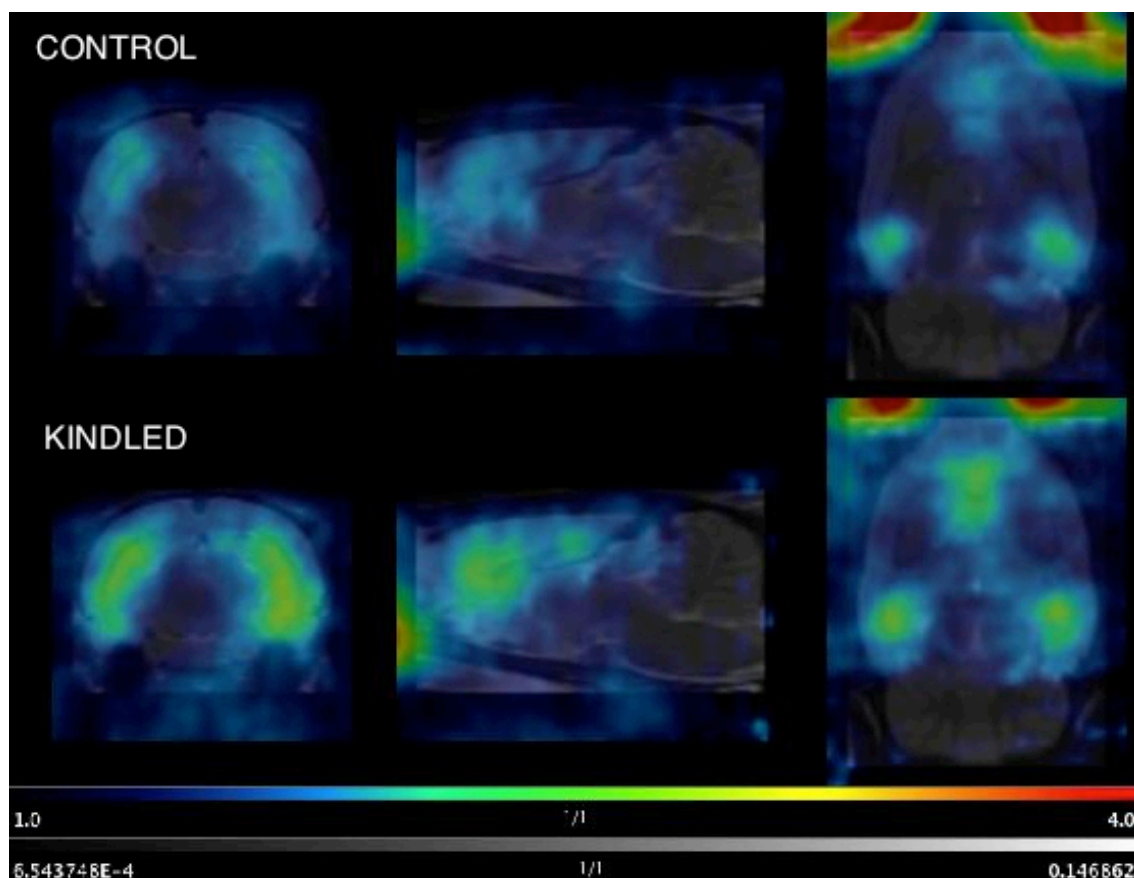
En los estudios del punto intermedio ya se observaba la diferencia entre ambos grupos de kindling. El grupo positivo presenta un hipometabolismo estadísticamente significativo respecto al grupo negativo ($p = 0,0189$). Además, en este punto temporal, ese hipometabolismo también es significativo respecto a los animales del grupo control ($p = 0,039$).

	Control	Kindling +	Kindling -
Corteza	1.08 ± 0.04	$0.94 \pm 0.02^*$	$1.05 \pm 0.02^\#$
Estriado	1.26 ± 0.03	1.24 ± 0.04	1.23 ± 0.04
Hipocampo	1.13 ± 0.02	1.12 ± 0.03	1.08 ± 0.02
Protuberancia	0.89 ± 0.03	0.98 ± 0.02	0.80 ± 0.06

Figura 36. Tabla comparativa entre el grupo control y los dos grupos con PTZ, los animales kindling positivo y los kindling negativo. Se observan diferencias en la corteza de los animales que posteriormente serán kindling positivo respecto al control (*; $p = 0,039$) y al grupo kindling negativo (#; $p = 0,0189$)

Estudios PET con 18F-MPPF

Al finalizar el kindling se realizó un estudio del receptor de serotonina 5-HT_{1A} en ambos grupos experimentales, con 6 animales en cada grupo. Para ello, se les administró a los animales 18F-MPPF y se realizó un estudio PET dinámico para calcular el *binding potential*. Una vez analizados los resultados de estos estudios, se observó un aumento del *binding potential* del 18F-MPPF en los animales sometidos al protocolo de kindling químico con PTZ. Este aumento fue estadísticamente significativo en septum ($p = 0,0305$) y el hipocampo del hemisferio izquierdo ($p = 0,0318$). El hipocampo analizado como una estructura única mostraba una diferencia entre ambos grupos próxima a la significación estadística establecida ($p = 0,0528$).



	Control	KQ
Corteza entorrinal	0.43 ± 0.03	0.61 ± 0.13
Estriado	0.41 ± 0.01	0.50 ± 0.06
Amígdala	0.37 ± 0.01	0.52 ± 0.05
Hipocampo	0.61 ± 0.03	0.96 ± 0.14
Septum	0.78 ± 0.06	0.98 ± 0.04 *
Cerebelo	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01

Figura 37. Tabla con los valores promedio de *binding potential* del ¹⁸F-MPPF en las estructuras más representativas de ambos grupos experimentales. En todas las estructuras estudiadas, el *binding potential* es mayor en el grupo de kindling químico aunque estadísticamente sólo es significativa esta diferencia en el septum y el hipocampo izquierdo.

*P<0,05

4.2.3 Estudios autorradiográficos con flúor-18

Autorradiografía de 18F-FDG

Se corregistraron todos los cortes de las autorradiografías *exvivo* con 18F-FDG hasta obtener una imagen tridimensional del cerebro de cada animal. Una vez obtenidas las imágenes 3D se normalizaron a un mismo template de PET de 18F-FDG y se les aplicó un mapa de VOIs. Se obtuvo la captación media en cada VOI de cada animal.

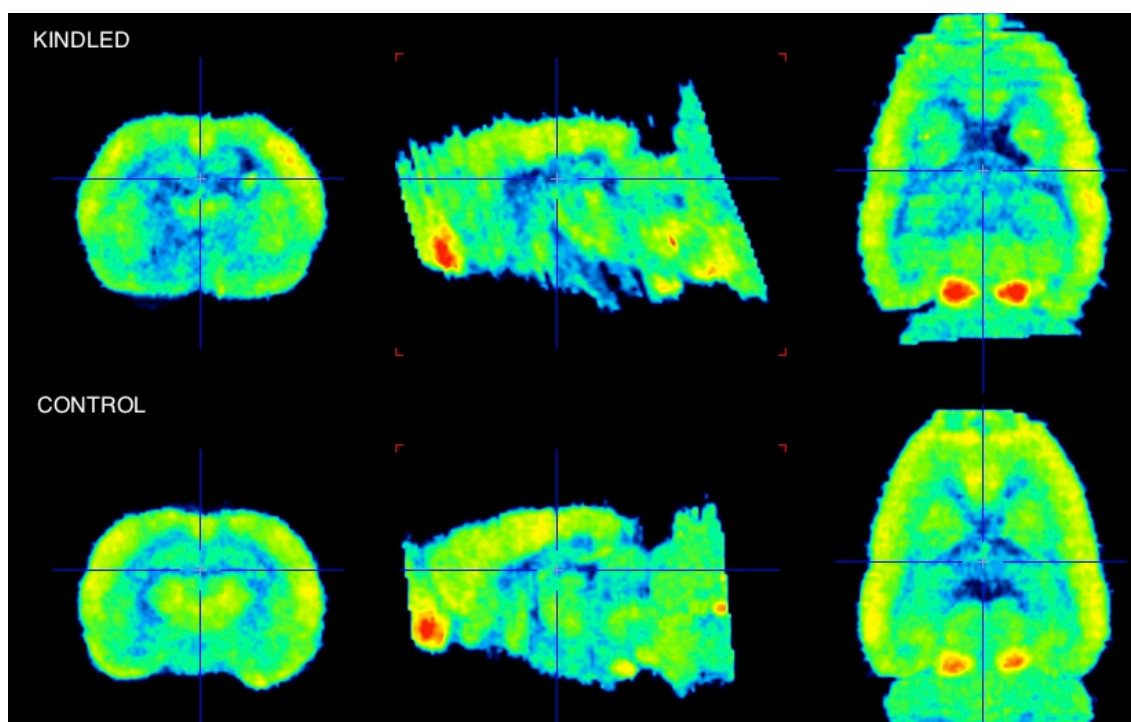


Figura 38. Comparativa de la captación de 18F-FDG *exvivo* (autorradiografía) entre ambos grupos (control y kindling químico) por estructuras normalizadas a cerebelo. No se observan diferencias significativas entre ambos grupos.

Al comparar los promedios de captación normalizados a cerebelo por grupos se observó un ligero hipometabolismo generalizado. Sin embargo, esta disminución en la captación no fue estadísticamente significativa.

Autorradiografía de 18F-MPPF

Tras finalizar el experimento, los animales fueron sacrificados y se les extrajo el cerebro y fue seccionado en cortes de 40 μ m. Esos cortes se incubaron con el marcador de 5-HT_{1A}, 18F-MPPF. La autorradiografía se digitalizó y se montaron en tres dimensiones. Posteriormente, se analizaron por VOIs y se compararon ambos grupos, control y kindling. No se observaron diferencias en ninguna de las regiones estudiadas entre ambos grupos.

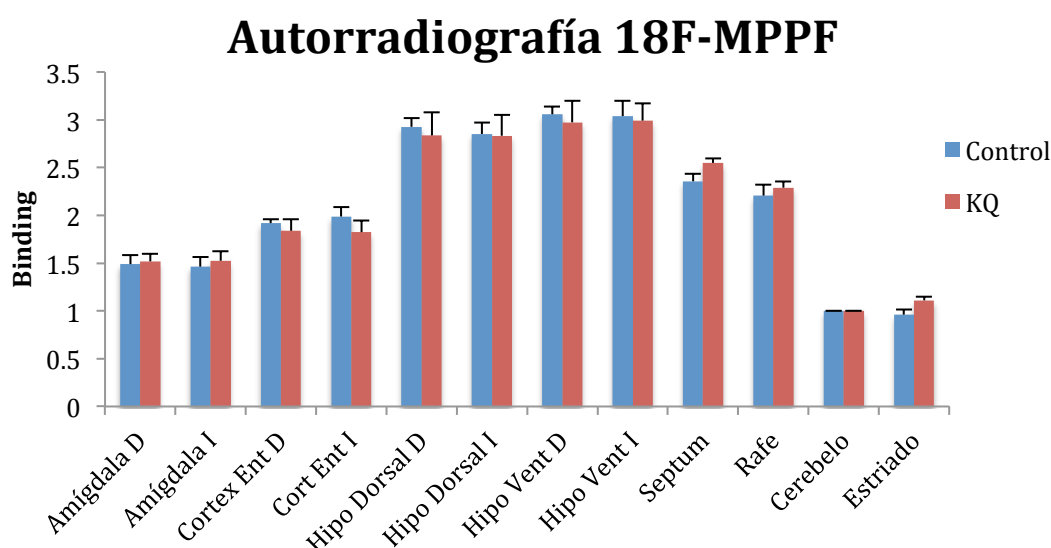


Figura 39. Análisis por VOIs de las autorradiografías de MPPF normalizados a cerebelo. No hay diferencias significativas, sin embargo, tanto septum ($p=0.075$) como estriado ($p=0.054$) tienden a ser significativamente diferentes entre ambos grupos, habiendo un aumento del receptor 5-HT_{1A} en estas estructuras de las ratas con kindling.

4.2.4 Autorradiografías de ligandos tritiados

Autorradiografía de 3H-AMPA

En los análisis de la autorradiografía con el ligando tritiado para marcar receptores AMPA se observó un aumento de este tipo de receptor glutamatérgico en los animales Kindling positivo en el hipocampo ventral ($p = 0,0047$) y en la corteza entorrinal ($p = 0,0277$). No se encontraron diferencia laterales en estas estructuras en ambos hemisferios.

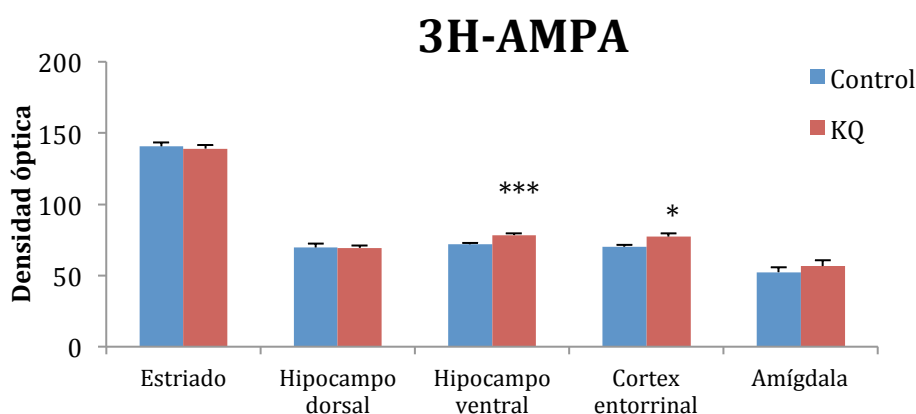


Figura 40. Representación gráfica de la densidad del receptor glutamatérgico tipo AMPA en varias regiones cerebrales en ambos grupos experimentales: Control (azul) y Kindling (rojo). Se puede observar el aumento en el grupo Kindling en hipocampo ventral y en la corteza entorrinal. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$

Autorradiografía de 3H-MK801

La autorradiografía con 3H-MK801, un ligando tritiado que se une a los receptores glutamatérgicos tipo NMDA, mostró un ligero aumento de este tipo de receptor únicamente en la corteza entorrinal ($p = 0,0111$). En el resto de estructuras cerebrales analizadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

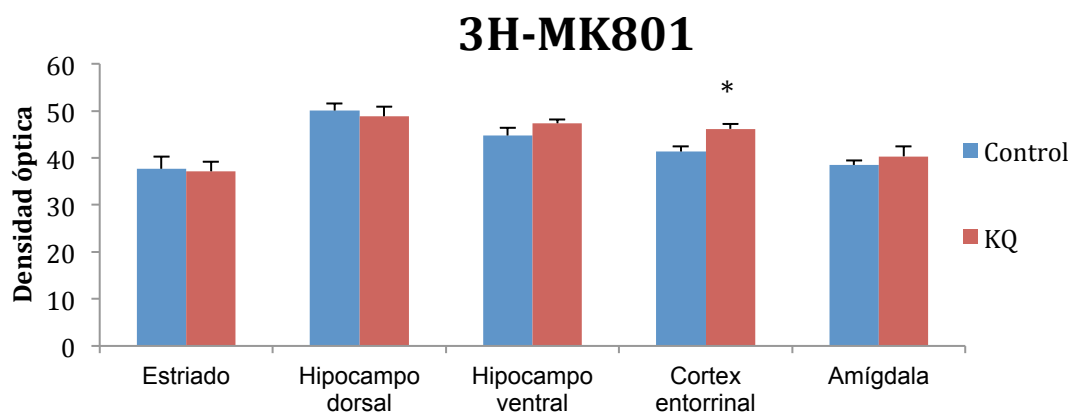


Figura 41. Gráfico de la densidad del receptor glutamatérgico tipo NMDA en varias regiones cerebrales en ambos grupos experimentales: Control (azul) y Kindling (rojo). Se puede observar el aumento en el grupo Kindling eléctrico en la corteza entorrinal. *P<0,05

Autorradiografía de 3H-Kainate

Tras analizar las imágenes de autorradiografía de kainato tritiado con ayuda del software de imagen ImageJ no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales. En el hipocampo y en la amígdala se detectó un aumento del marcaje con este ligando en el grupo de Kindling químico pero en ninguna de las estructuras este aumento es estadísticamente significativo ($p = 0,246$ y $p = 0,256$, respectivamente).

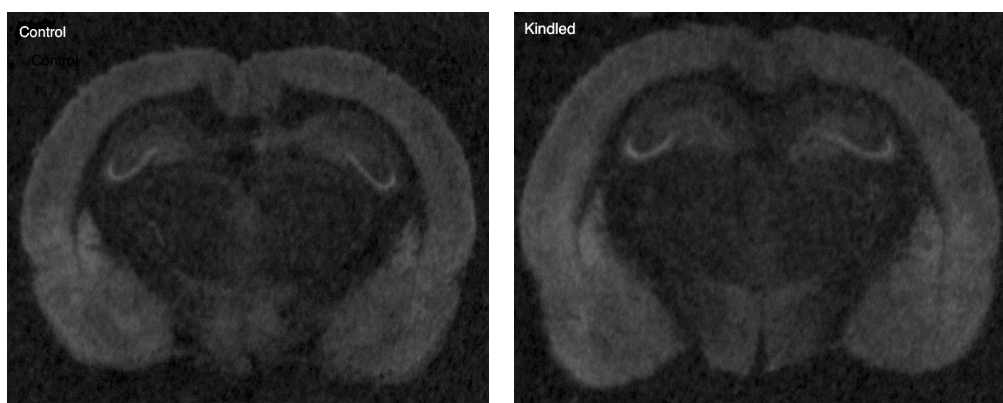


Figura 42. Imagen de la densidad del receptor glutamatérgico tipo kainato en ambos grupos experimentales: Control (izquierda) y Kindling (derecha). En este caso, no se observan diferencias significativas en la población de este receptor entre ambos grupos experimentales.

Autorradiografía de 3H-Paroxetina

También se comprobó si el kindling químico modificaba la población de receptores recaptadores de la serotonina en diferentes áreas cerebrales mediante el ligando tritiado 3H-paroxetina. Al analizar las imágenes obtenidas de esta autorradiografía se observó que este tipo de receptor no estaba modificado en el grupo de kindling respecto al grupo control en ninguna estructura.

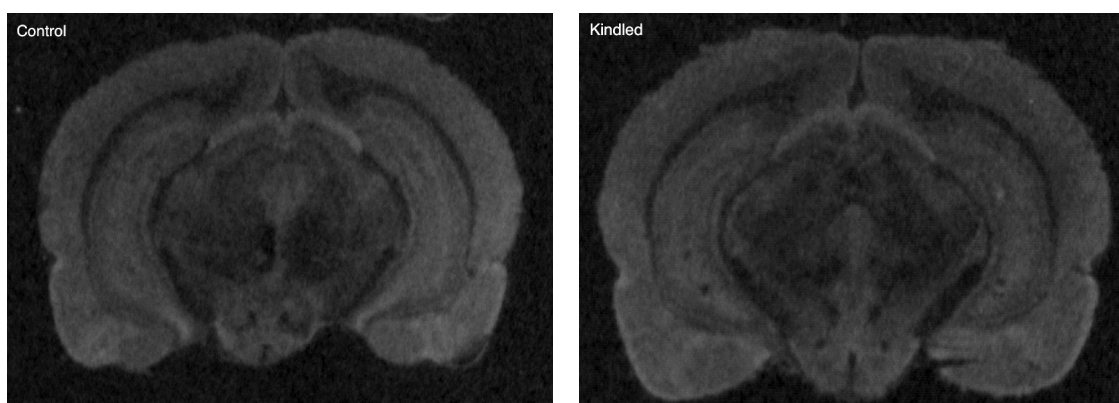


Figura 43. Autorradiografía de la densidad del recaptador de serotonina en un corte coronal: Control (izquierda) y kindling químico (derecha). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en el análisis por ROIs.

Autorradiografía de 3H-Flumazenilo

El 3H-flumazenilo es un ligando tritiado antagonista de los receptores de benzodiacepinas. Por lo tanto, con este ligando podremos ver si el kindling químico con PTZ modifica el sistema gabaérgico de estos animales. Tras analizar la captación de este ligando en diferentes estructuras cerebrales en ambos grupos, observamos que no hay diferencia significativa en ninguna de ellas. Sin embargo, en todas las estructuras analizadas es mayor la unión de este ligando en todas las estructuras del grupo de kindling químico pero sin llegar a ser esta diferencia significativa estadísticamente en ninguna de ellas.

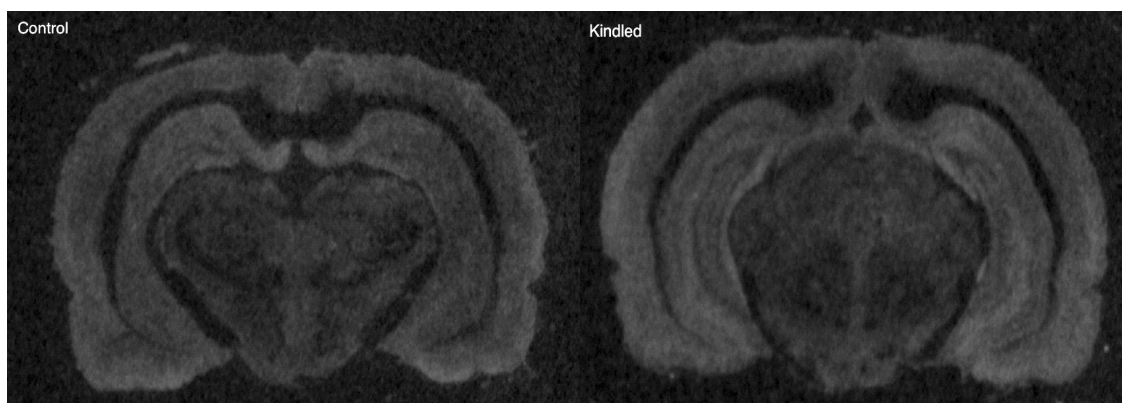


Figura 44. Imagen invertida de la autorradiografía de 3H-flumazenilo: Control (izquierda) y Kindling (derecha). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos experimentales.

4.2.5 Estudios de marcaje con fluoróforos

Los cortes cerebrales de los animales sometidos al protocolo de kindling químico con PTZ fueron marcados con una tinción de fluorojade. No se detectó marcaje de neurodegeneración en ninguna de las muestras analizadas de varias estructuras cerebrales en ninguno de los grupos experimentales.

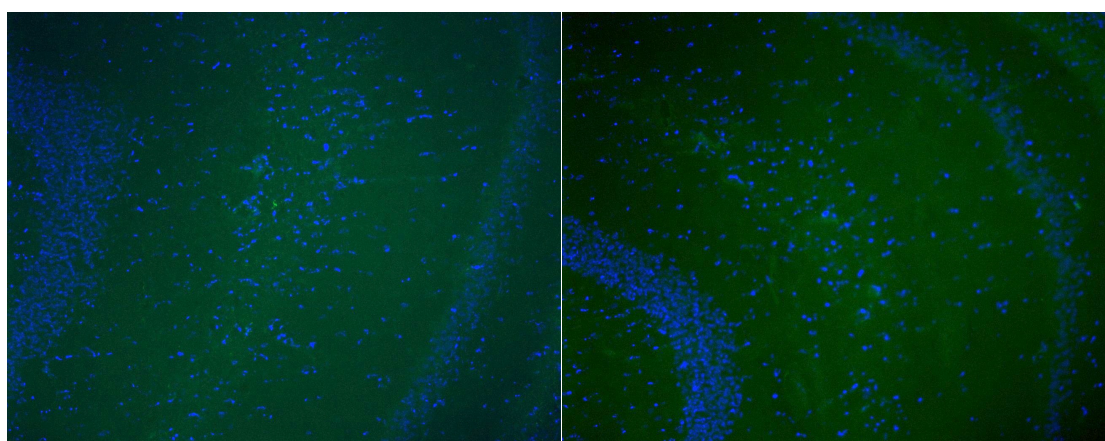


Figura 45. Imágenes fusionadas de la emisión obtenida al excitar a 385 nm (fluorojade) y con luz ultravioleta (DAPI) en el microscopio de epifluorescencia. A la izquierda se observa CA1 de hipocampo dorsal de un animal del grupo control. A la derecha, el mismo área de un animal de kindling con PTZ. No se observaron diferencias entre ambos grupos, en los que todos los animales se consideraron negativos para el marcaje con fluorojade.

Los estudios con GFAP para detectar la presencia de gliosis como respuesta al kindling con PTZ no mostraron diferencias en ninguna de las estructuras estudiadas (estriado, ventrículo, hipocampo, rafe y amígdala) entre los grupos control y kindling.

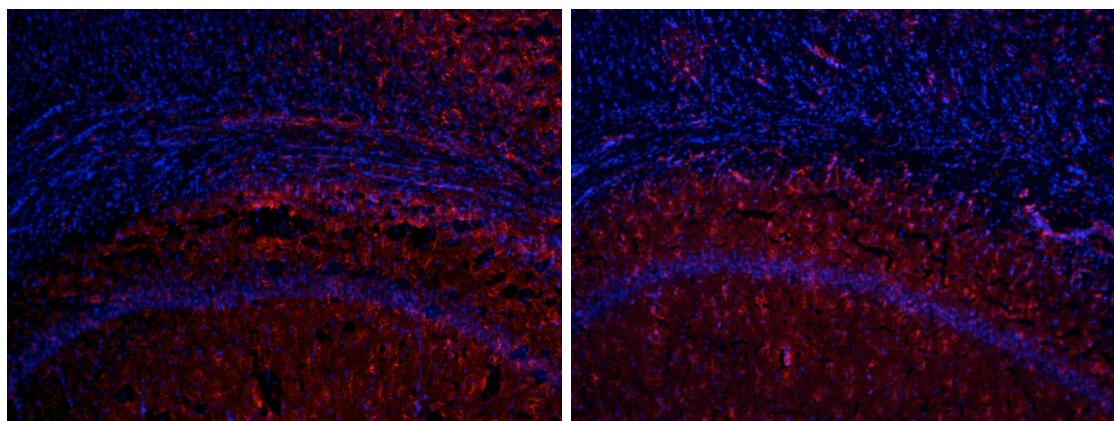


Figura 46. Imágenes de un animal representativo de cada grupo experimental con doble marcaje de fluorescencia GFAP-DAPI. El marcaje con antiGFAP (rojo) no señala diferencias en la población de células gliales entre el grupo control (izqda.) y el grupo de kindling químico (dcha).

Experimento <i>in vitro</i>	Resultados obtenidos en kindling químico
18F-FDG	No se observaron diferencias
18F-MPPF	No se observaron diferencias
3H-AMPA	Receptor AMPA aumentado en hipocampo ventral y corteza entorrinal
3H-MK801	Mayor densidad del receptor NMDA en corteza entorrinal
3H-Kainato	No se observaron diferencias
3H-Paroxetina	No se observaron diferencias
3H-Flumazenilo	No se observaron diferencias
Fluor Jade	Test de neurodegeneración negativo
GFAP	No se halló gliosis en las zonas estudiadas

Figura 47. Tabla resumen de los resultados de los experimentos *in vitro* realizados con los cortes cerebrales de los animales de kindling químico.

4.3 MODELO KINDLING ELÉCTRICO

Los animales kindling se estimularon diariamente de lunes a viernes. El umbral de postdescarga de estos animales estuvo entre los 75 y los 175 μ A. El estímulo aplicado fue de 50 μ A por encima de su umbral de postdescarga.

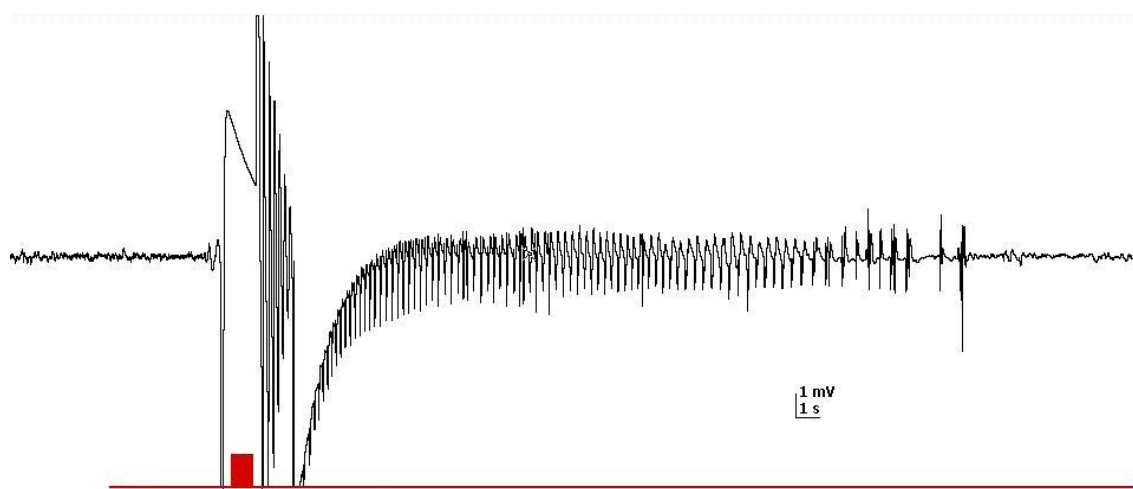


Figura 48. Registro eléctrico de la postdescarga producida por un estímulo eléctrico de 50 A por encima del umbral del animal. En la parte inferior de la imagen se puede ver el estímulo aplicado al animal (trazo rojo). En negro se observa el registro en CA3 de hipocampo posterior con descargas epileptiformes como respuesta al estímulo eléctrico.

Tras un promedio de $17,6 \pm 2,2$ estimulaciones todos los animales alcanzaron el kindling, es decir, el nivel 5 en la escala comportamental de Racine (Racine 1972a, 1972b). Una vez alcanzado el kindling, un animal obtendrá una respuesta convulsiva de nivel 5 en la escala comportamental cada vez que se le aplique el estímulo utilizado durante el experimento.

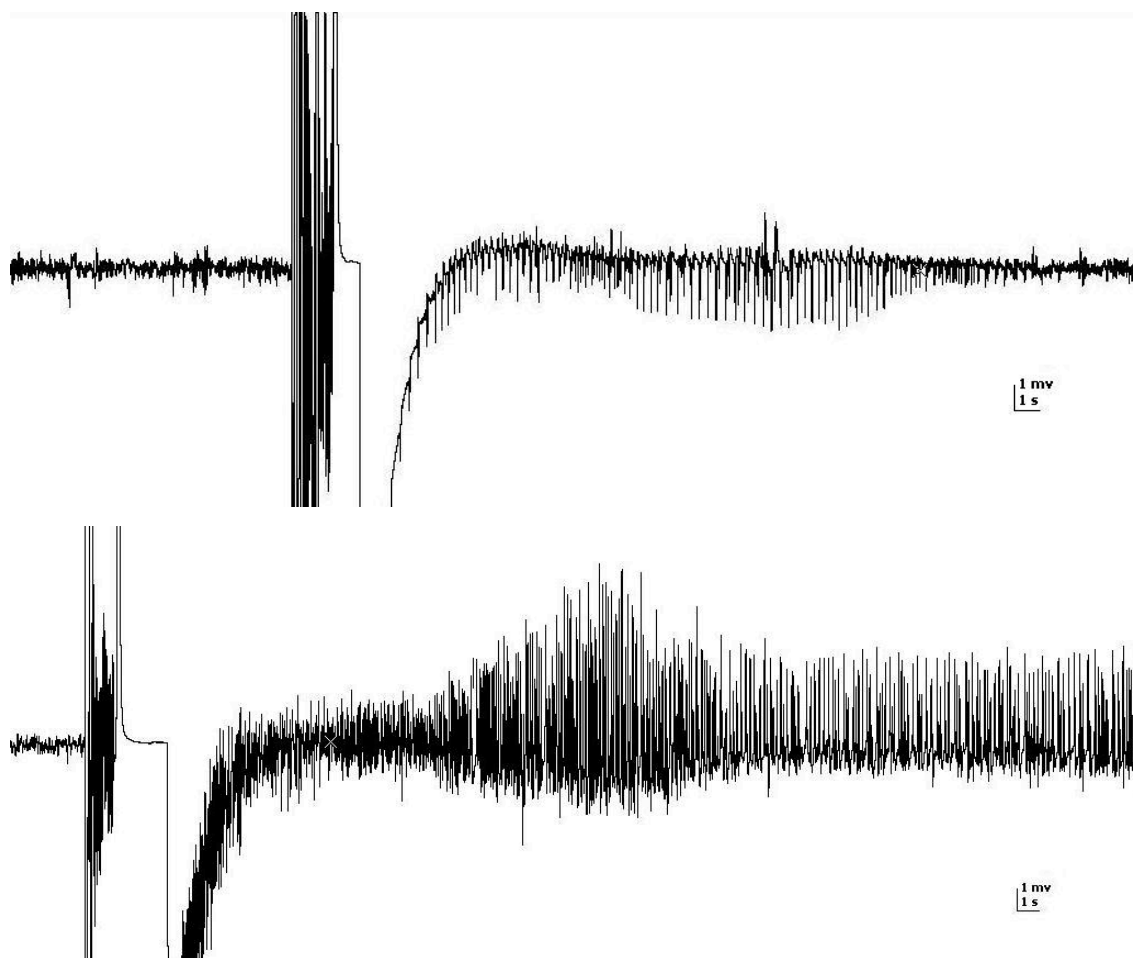


Figura 49. Evolución de la postdescarga provocada con el estímulo en un mismo animal. En la imagen superior se observa la postdescarga provocada en la primera sesión de estimulación. En la imagen inferior, el registro del mismo animal una vez ha alcanzado crisis convulsivas tras la aplicación del estímulo.

4.3.1 Evaluación comportamental

La evolución comportamental de ambos grupos estimulados, kindling (n = 8) y kindling+8OH (n = 8), fue similar durante toda la duración del experimento. El promedio de estimulaciones necesarios para alcanzar el estadio 5 de la escala de Racine en el grupo pretratado con 8-OH-DPAT no difirió significativamente del grupo de kindling eléctrico. Además, en ninguna de las sesiones de estimulación hubo diferencias significativas en el nivel promedio alcanzado en la escala.

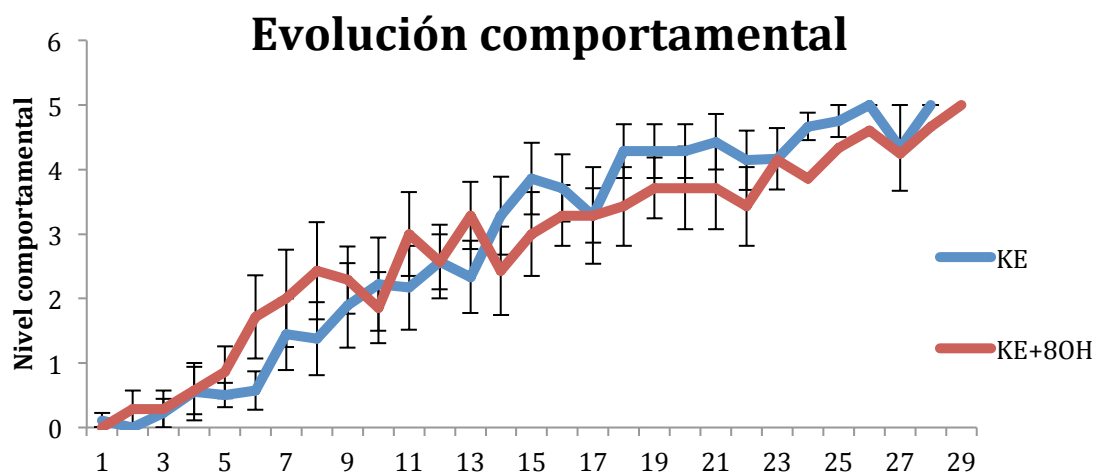


Figura 50. Gráfico de la evolución de la respuesta comportamental al estímulo durante el protocolo de estimulación de acuerdo a la escala de Racine (Racine 1972a, 1972b). En el gráfico se observa el aumento en la escala comportamental de ambos grupos de kindling sin llegar a haber diferencias significativas entre éstos en ninguna de la sesiones de estimulación.

4.3.2 Electrofisiología

También se evaluó la respuesta eléctrica al estímulo en estos dos grupos. Tras aplicar el estímulo a cada animal se registró la respuesta durante 2 minutos y se midió la duración de la postdescarga. Durante las primeras sesiones de estimulación se observó que la postdescarga era de mayor duración en el grupo pretratado con 8-OH-DPAT. Entre la séptima y la undécima sesión, la duración de la postdescarga es significativamente superior en el grupo al que se le administró 8-OH-DPAT 20 minutos antes de la estimulación eléctrica en hipocampo. A partir de la duodécima sesión la duración de la postdescarga era similar en ambos grupos, no habiendo diferencias significativas. Se observa un tendencia en el grupo de kindling eléctrico de aumento de la duración de la postdescarga a lo largo de las sesiones que no se aprecia en el grupo pretratado con 8-OH-DPAT, que comienza con una duración promedio mayor pero que no progresa a lo largo del desarrollo del modelo.

Sin embargo, en las primeras sesiones de estimulación algunos animales pretratados con 8-OH-DPAT no tuvieron una postdescarga tras el estímulo. En la primera sesión de estimulación, el 50% de los animales (4 de un total de 8) no respondieron al estímulo con una postdescarga. En la segunda sesión, el número de animales que no respondieron al estímulo se redujo a la mitad, siendo sólo un 25%. En la tercera sesión todos los animales tuvieron una postdescarga excepto uno de ellos, que no respondió al estímulo hasta la quinta sesión.

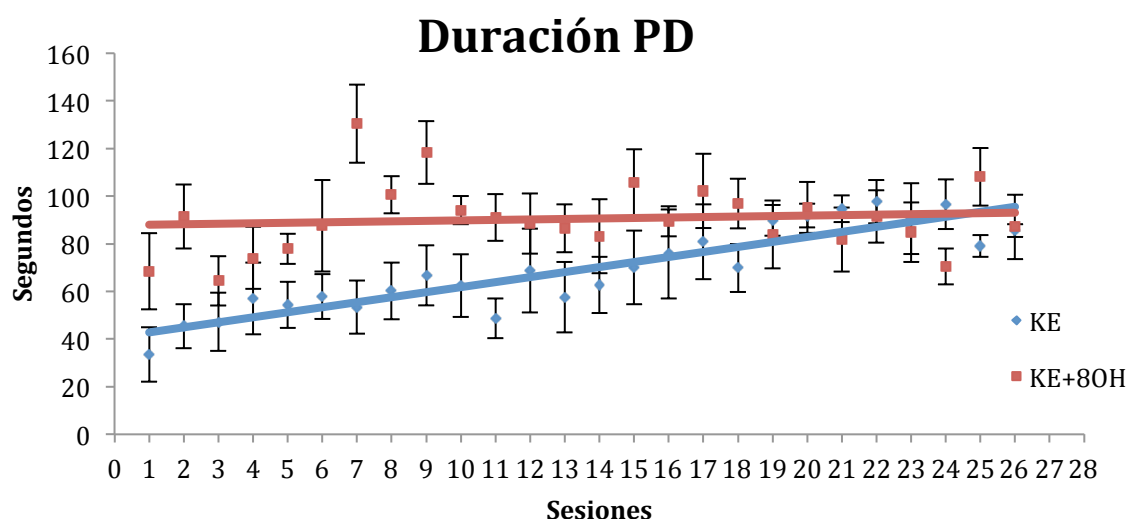


Figura 51. Duración media en segundos de la postdescarga producida por el estímulo eléctrico de cada grupo experimental. Se observan diferencias entre el grupo sin 8-OH-DPAT y el grupo pretratado con este agonista de serotonina. En las sesiones de la 7 a la 11 la duración de la postdescarga es mayor en el grupo al que se le inyectó 8-OH-DPAT 20 minutos antes del estímulo eléctrico. En las sesiones posteriores la duración de la respuesta eléctrica es similar en ambos grupos.

A partir de los registros de la postdescarga también pudimos medir la frecuencia de las puntas epileptiformes de la respuesta al estímulo. Posteriormente promediamos la frecuencia de todos los animales de cada grupo en cada sesión. En la gráfica se puede comprobar que no hay diferencias entre los grupos y tampoco entre las sesiones. La frecuencia de descarga no varía prácticamente a lo largo del experimento y, por lo tanto, tampoco varía según la respuesta comportamental.

En la evaluación comportamental de los animales pretratados con 8-OH-DPAT se observó la aparición de síndrome serotoninérgico en los primeros días de tratamiento, pero, al contrario que en los animales de kindling químico, esta alteración del comportamiento no aparecía tras la primera semana de tratamiento.

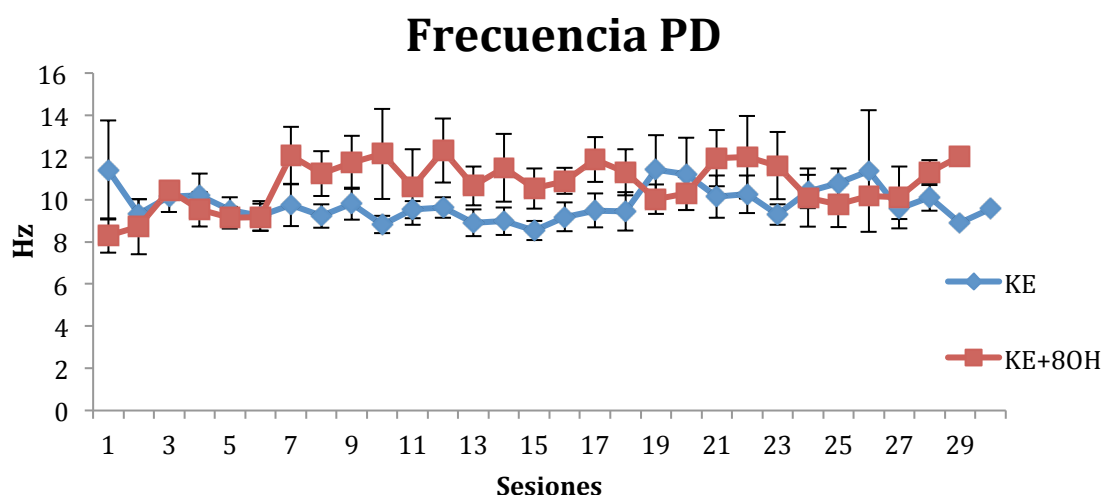


Figura 52. Representación gráfica de la frecuencia de la postdescarga en cada grupo a lo largo de las sesiones de estimulación. En azul, el grupo de kindling. En rojo, el grupo de kindling con 8-OH-DPAT. No se observan diferencias entre ambos grupos en la frecuencia de descarga tras el estímulo.

4.3.3 Estudios de imagen PET

Estudios PET con 18F-FDG

Al finalizar el kindling eléctrico y una vez que todos los animales han alcanzado el estado de kindling se les realizó un escáner PET tras inyectarles 18F-FDG y dejar 30 minutos de incorporación. El tamaño muestral de los grupos experimentales fue de 8 animales por grupo. Una vez obtenido los valores de captación de cada región se normalizaron a la captación del cerebelo. Tras promediar la captación de ambos grupos se puede observar una disminución de la captación del análogo de glucosa en el grupo de kindling eléctrico en varias estructuras. Esta disminución es estadísticamente significativa en el estriado ($p = 0,013$) y en la corteza ($p = 0,041$).

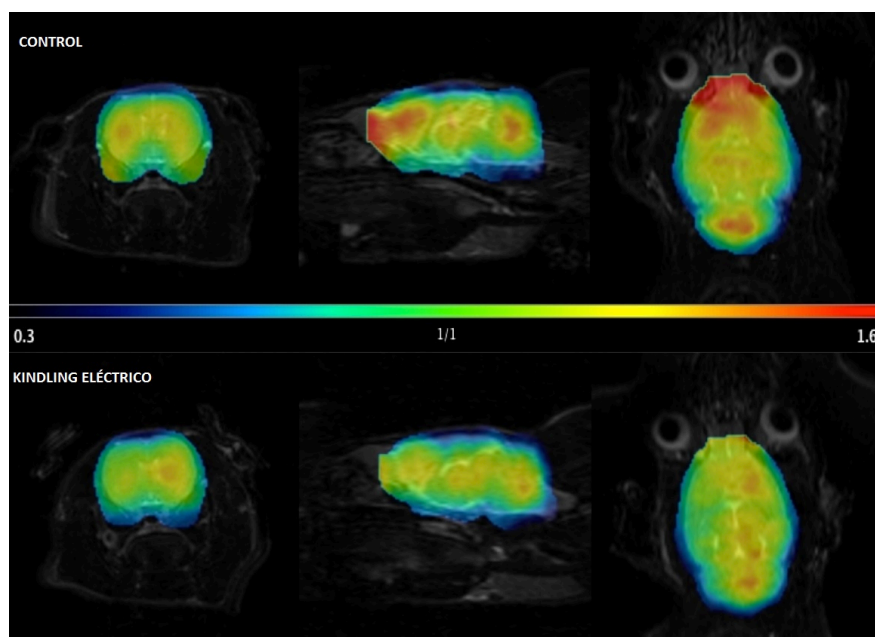


Figura 53. Imagen PET de la captación de ¹⁸F-FDG fusionada con la imagen de resonancia magnética en los animales de los grupos experimentales: grupo control (azul) y grupo kindling (rojo). Se observaron diferencias estadísticamente significativa en la corteza ($p = 0,041$) y en el estriado ($p = 0,013$).

Al separar las regiones en los dos hemisferios podemos ver que aunque en la totalidad del hipocampo no se observen diferencias, sí parece haberlas en el hipocampo dorsal del hemisferio derecho. Sin embargo, esta diferencia sigue sin ser estadísticamente significativa ($p = 0,071$).

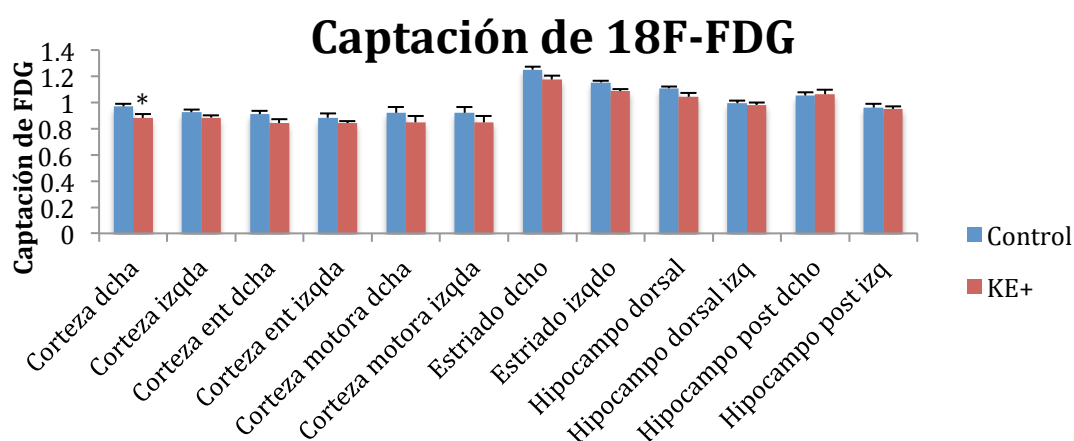


Figura 54. Comparativa de los dos grupos experimentales separando las estructuras por hemisferios. Se observa un hipometabolismo en el grupo de kindling en todas las regiones. Sin embargo, únicamente es significativa estadísticamente esa diferencia en la corteza del hemisferio contralateral. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Las diferentes regiones de la corteza separándolas por hemisferio muestran que el hipometabolismo se daba en todas las regiones de ésta. La mayor diferencia se da en el hemisferio derecho, dónde la diferencia es significativa ($p = 0,0332$).

Al analizar los grupos pretratados con 8-OH-DPAT se observó un hipermetabolismo en el hipocampo ventral del grupo de kindling con 8-OH-DPAT respecto a su control, también pretratado con el agonista de 5-HT_{1A} ($p = 0,0442$). Este aumento de la captación de 18F-FDG se vio en ambos hemisferios. También se vio un hipermetabolismo en la corteza entorrinal, pero en este caso, la diferencia únicamente fue significativa en la corteza del hemisferio derecho, el contralateral a la estimulación eléctrica ($p = 0,0349$).

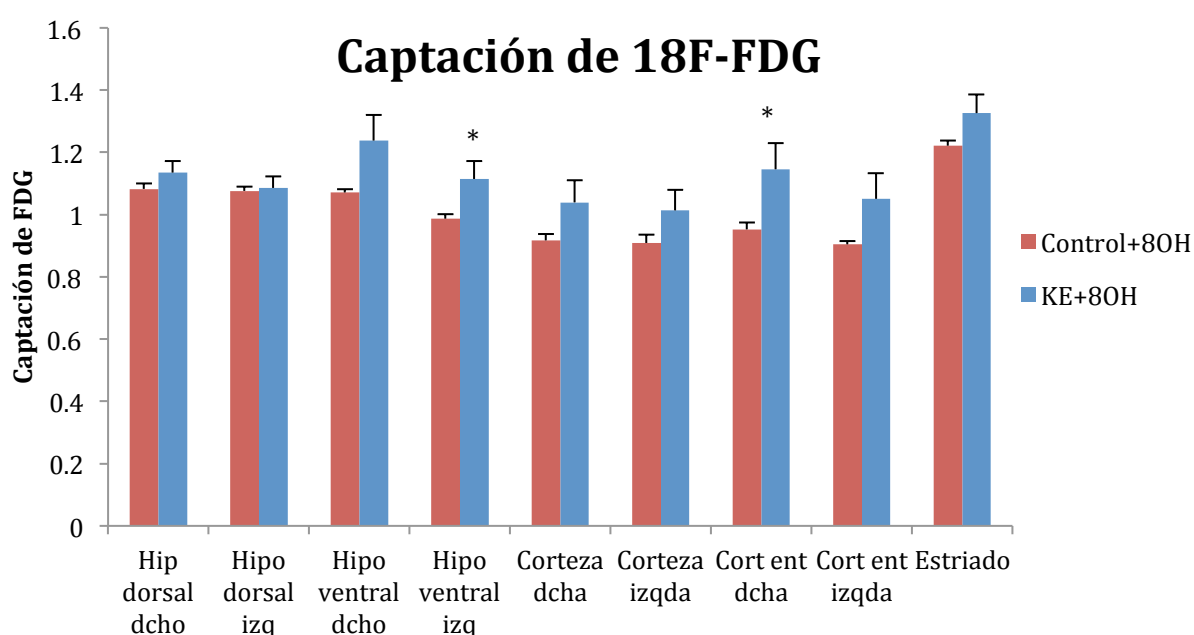


Figura 55. Representación gráfica de la captación de 18F-FDG en determinadas estructuras de los grupos pretratados con 8-OH-DPAT. Se han representado todas las estructuras en las que se observó un hipermetabolismo. Sin embargo, este aumento del metabolismo únicamente fue significativo estadísticamente en el hipocampo ventral y en la corteza entorrinal derecha. * $P < 0,05$

Al comparar la actividad de diferentes estructuras cerebrales de los 4 grupos experimentales juntos se observa un hipermetabolismo de los animales kindling pretratados con 8-OH-DPAT en estriado, hipocampo y corteza

entorrinal respecto al grupo de kindling sin agonista de 5-HT_{1A}. El grupo control pretratado con 8-OH-DPAT no mostró diferencias con el grupo control en ninguna de las estructuras analizadas.

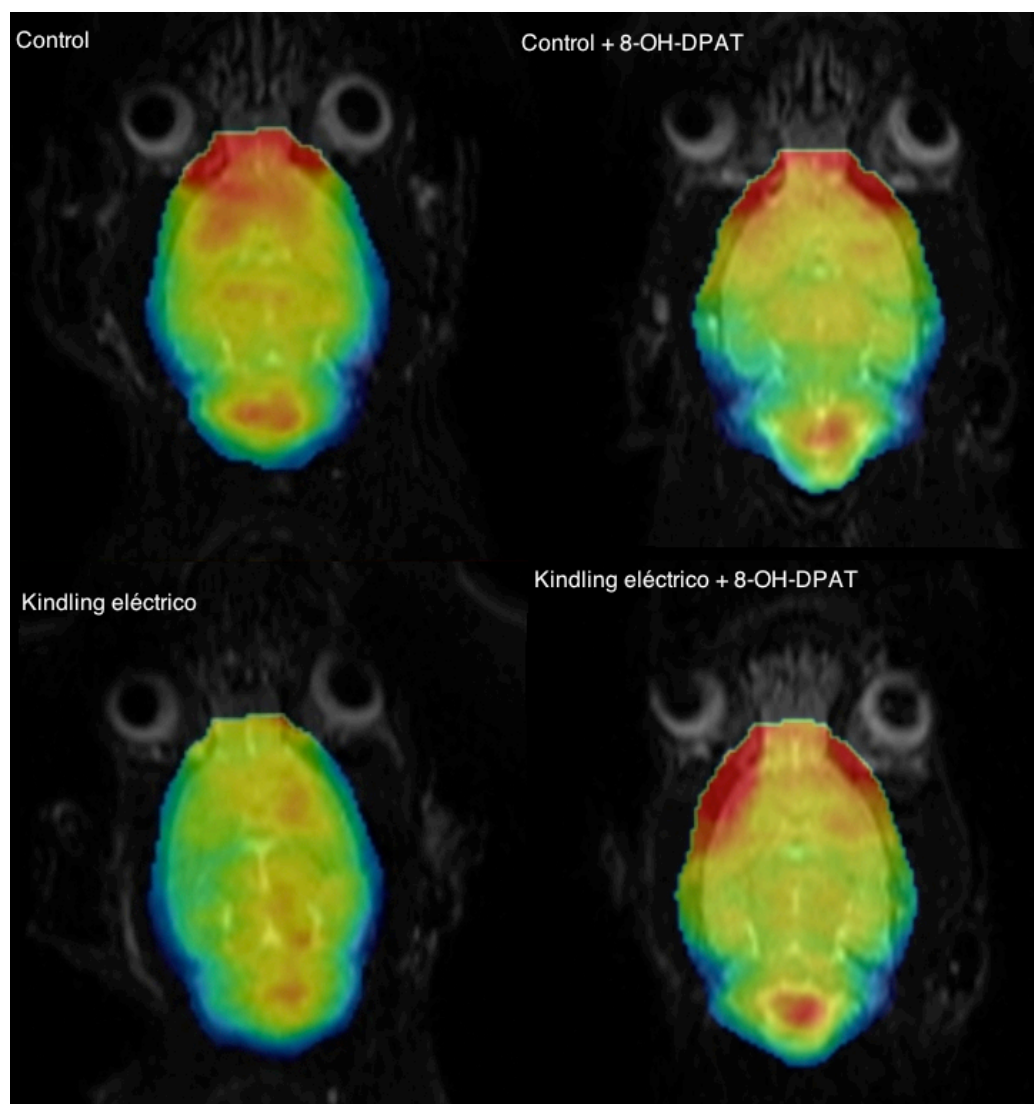


Figura 56. Imagen PET comparativa de los 4 grupos experimentales de kindling eléctrico. La captación de las estructuras en todos los animales ha sido normalizada a la captación del cerebelo. Se observó una disminución de la captación estadísticamente significativa en el grupo de kindling eléctrico en el estriado y en la corteza cerebral ($p = 0,013$ y $p = 0,041$, respectivamente), respecto al grupo control. En el resto de grupos no se observaron diferencias.

Estudios PET con 18F-MPPF

Después del escáner con 18F-FDG se realizó el estudio con 18F-MPPF a los animales de ambos grupos. Los estudios PET con 18F-MPPF fueron adquisiciones dinámicas que, posteriormente, se analizaron calculando el *binding potential* de este radiotrazador en cada grupo experimental. El grupo kindling (n = 6) muestra un mayor *binding potential* del trazador al receptor 5-HT_{1A} en todas las regiones cerebrales que el grupo control (n = 6). Esta diferencia fue más pronunciada y estadísticamente significativa en la corteza entorrinal del hemisferio derecho (p = 0,0427) y el septum (p = 0,0426).

	Control	Kindling eléctrico
Corteza entorrinal derecha	0.39 ± 0.04	0.52 ± 0.04*
Corteza entorrinal izquierda	0.32 ± 0.06	0.41 ± 0.04
Septum	0.66 ± 0.02	0.80 ± 0.05*
Amígdala derecha	0.40 ± 0.05	0.52 ± 0.05
Amígdala izquierda	0.26 ± 0.05	0.35 ± 0.05
Hipocampo derecho	0.79 ± 0.09	0.98 ± 0.10
Hipocampo izquierdo	0.45 ± 0.08	0.65 ± 0.10
Cerebelo	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01

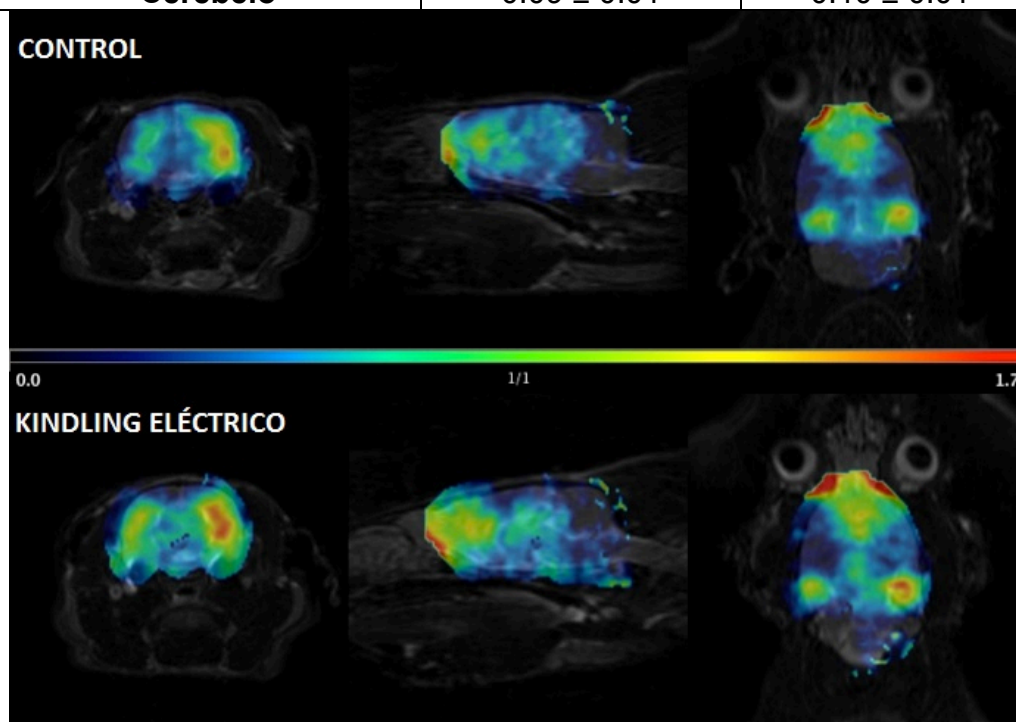


Figura 57. Comparación del *binding potential* del radiotrazador 18F-MPPF entre el grupo control y el grupo de kindling. Tabla con los valores de binding potential de cada región en

ambos grupos (arriba) e imagen PET de la captación de 18F-MPPF en ambos grupos (abajo).

*P<0,05

Al analizar los estudios de los grupos pretratados con 8-OH-DPAT, no se observaron diferencias entre el grupo de kindling eléctrico pretratado con 8-OH-DPAT y su grupo control, al que también se le administraba el agonista de 5-HT_{1A} todos los días de lunes a viernes.

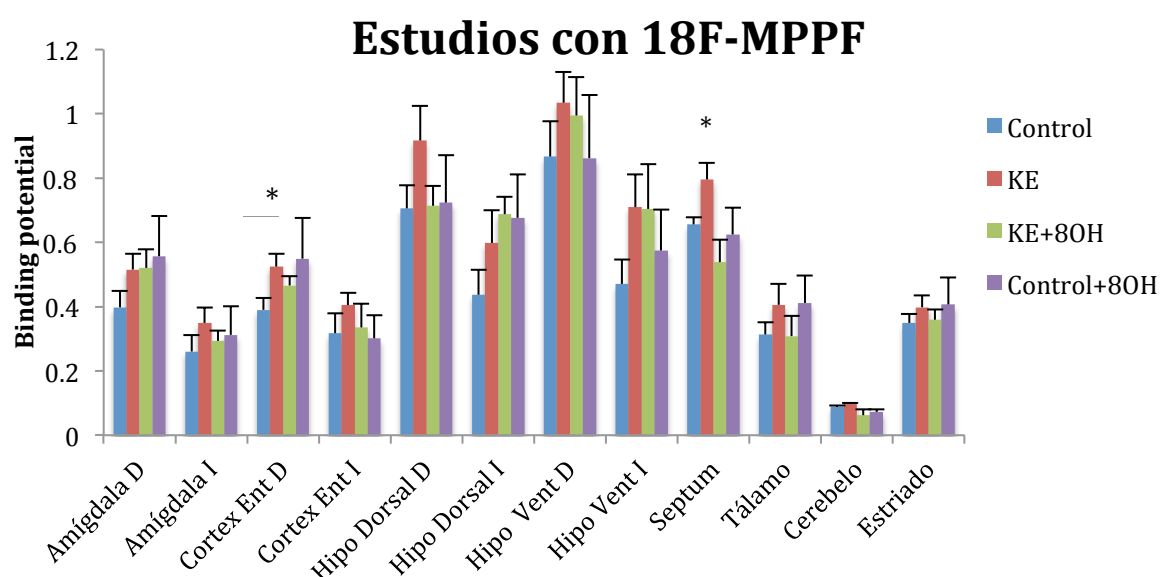


Figura 58. Gráfica comparativa de la captación del radiotrazador 18F-MPPF entre los cuatro grupos experimentales de kindling eléctrico. No se observan diferencias entre los grupos de 8-OH-DPAT. *P<0,05

4.3.4 Estudios autorradiográficos con flúor-18

Autorradiografía de 18F-FDG

Una vez sacrificados los animales y el cerebro extraído se realizó una autorradiografía de la captación de FDG con cortes de todo el cerebro espaciados entre sí en 200 μ m. Tras revelar las películas y digitalizar las imágenes, se montaron las autorradiografías en 3 dimensiones y se analizaron

de la misma manera que los estudios PET con 18F-FDG. La comparación del promedio de captación de cada región entre ambos grupos mostró un hipometabolismo generalizado en la mayoría de las estructuras cerebrales. Sin embargo, ninguna estructura mostró una diferencia estadísticamente significativa.

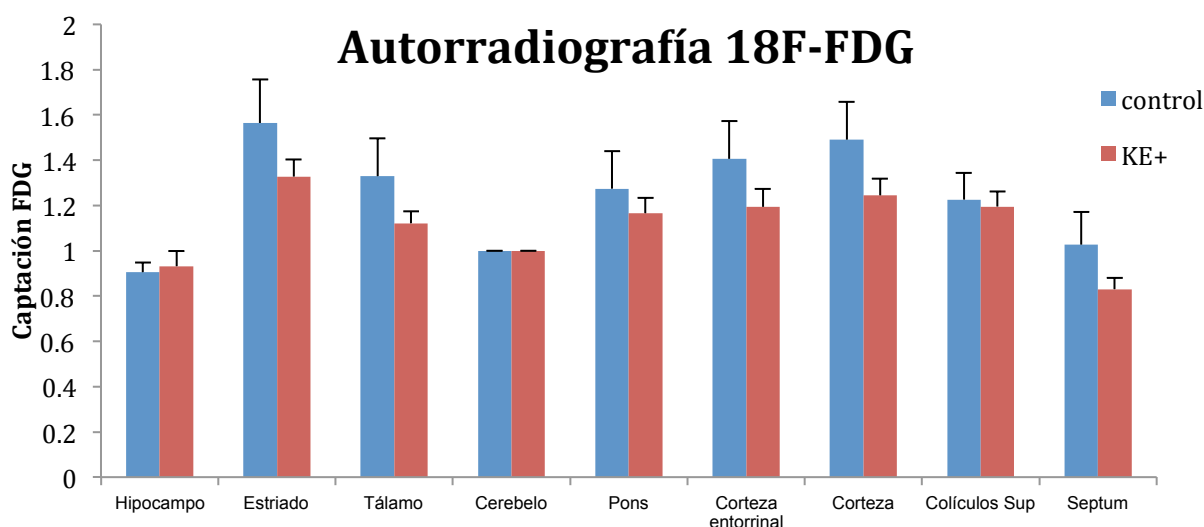


Figura 59. Gráfica comparativa entre diferentes regiones todas ellas normalizadas a cerebelo. En ella se observa una menor captación del radiotrazador 18F-FDG en el grupo de kindling eléctrico respecto al grupo control, sin llegar a ser en ninguna estructura estadísticamente significativa esta diferencia.

Autorradiografía de 18F-MPPF

Los cortes utilizados para la autorradiografía de 18F-FDG, una vez la actividad hubo decaído, se utilizaron para realizar la autorradiografía con 18F-MPPF. Una vez reveladas las películas y digitalizadas se corregistaron en 3 dimensiones con el software Pmod. Posteriormente, los cerebros tridimensionales se analizaron por VOIs y se compararon la actividad promedio de cada estructura entre los dos grupos experimentales.

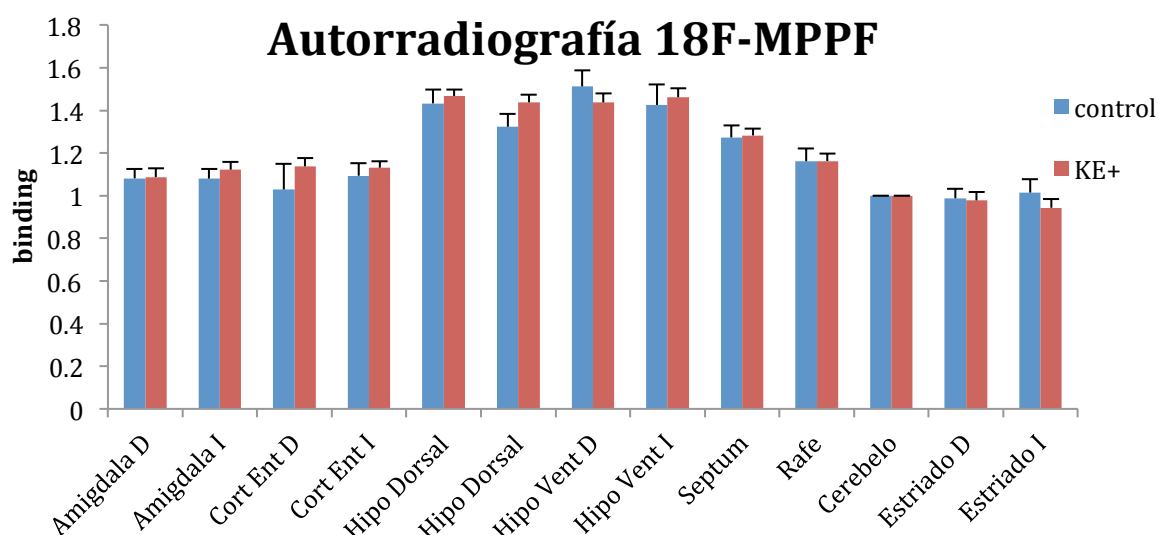


Figura 60. Representación gráfica de la captación de 18F-MPPF en el grupo control y el grupo de kindling eléctrico. No se observan diferencias significativas entre ambos grupos en la captación de este radiofármaco mediante autorradiografía exvivo.

4.3.5 Autorradiografía de ligandos tritiados

Autorradiografía de 3H-AMPA

El marcaje con el ligando tritiado 3H-AMPA, que se une a este tipo de receptor glutamatérgico, mostró un aumento de este receptor en los animales del grupo de kindling frente al grupo control. Este aumento fue estadísticamente significativo en estriado ($p = 0,0444$) e hipocampo ventral de ambos hemisferios ($p = 0,0292$). En hipocampo dorsal y corteza entorrinal también se observa un aumento de este tipo de receptor glutamatérgico pero la diferencia no es estadísticamente significativa.

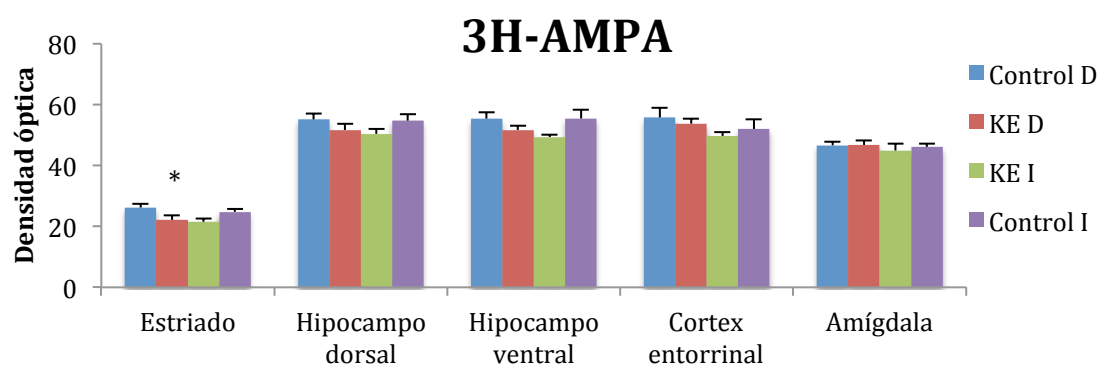


Figura 61. Análisis de la autorradiografía con 3H-AMPA de los grupos control y kindling eléctrico. Tanto en hipocampo ventral como en estriado se observa un aumento del marcaje de este ligando en el grupo de kindling eléctrico respecto al control. *P<0,05

Autorradiografía de 3H-NMDA

La autorradiografía con 3H-MK801 mostró un descenso de la población de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA en los animales kindling positivo en ambos hemisferios tanto en estriado ($p = 0,013$) como en hipocampo dorsal ($p = 0,0082$). En la corteza entorrinal solo se observó un descenso del marcaje de este tipo de receptor en el hemisferio izquierdo ($p = 0,0024$).

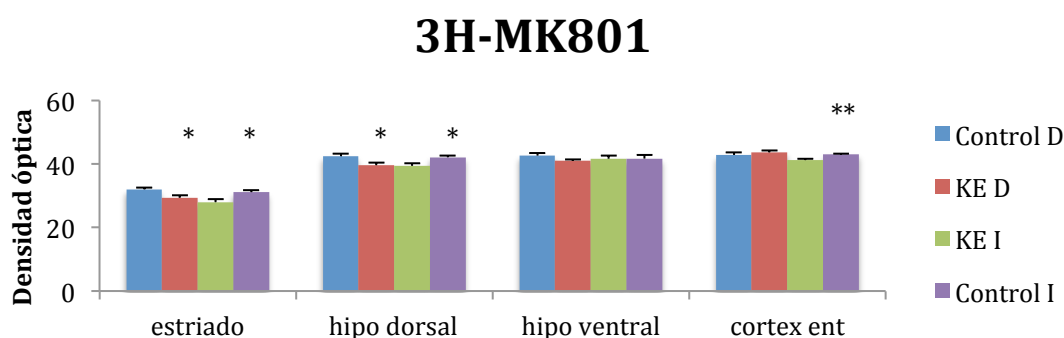


Figura 62. Análisis de la autorradiografía con 3H-MK801 de los grupos control y kindling eléctrico. Se observa una disminución del marcaje de este ligando tanto en hipocampo dorsal, como en estriado en el grupo de kindling eléctrico respecto al control. En el caso de la corteza entorrinal únicamente se observó diferencias en el hemisferio izquierdo. *P<0,05; **P<0,01

Autorradiografía de 3H-Kainato

El análisis de la densidad del receptor de glutamato tipo kainato mostró únicamente diferencia entre ambos grupos en la amígdala ($p = 0,022$), señalando una disminución de este tipo de receptor en los animales de kindling eléctrico. En el resto de estructuras se percibe un descenso de la intensidad de marcaje en el grupo de kindling eléctrico respecto a su control pero sin ser significativa esta diferencia.

	DCHA		IZQDA	
	control	KE	control	KE
Estriado	26.20 ± 0.92	24.97 ± 0.89	26.85 ± 0.87	24.46 ± 0.97
Hipocampo dorsal	20.00 ± 0.65	19.53 ± 0.82	19.06 ± 0.65	17.48 ± 0.47
Hipocampo ventral	24.07 ± 1.11	22.05 ± 0.63	21.84 ± 0.67	20.75 ± 1.03
Cortex entorrinal	25.53 ± 1.15	24.08 ± 0.92	23.95 ± 0.77	22.32 ± 0.89
Amígdala	23.51 ± 1.28	22.94 ± 1.10	24.50 ± 0.67	21.93 ± 0.73*

Figura 63. Tabla con los valores de la intensidad de señal del marcaje con el ligando 3H-Kainato en el grupo control y el grupo de kindling eléctrico. En ambos grupos se representa por separado cada hemisferio, ya que la estimulación se da en el izquierdo únicamente. Hubo diferencia entre ambos grupos en la amígdala del hemisferio ipsilateral. * $P < 0,05$

Autorradiografía de 3H-Paroxetina

El estudio del recaptador de serotonina a través de la autorradiografía de tritio con el ligando 3H-paroxetina no reveló ninguna modificación de este a causa del protocolo de kindling eléctrico. En ninguna de las estructuras estudiadas se observó diferencia entre los grupos experimentales.

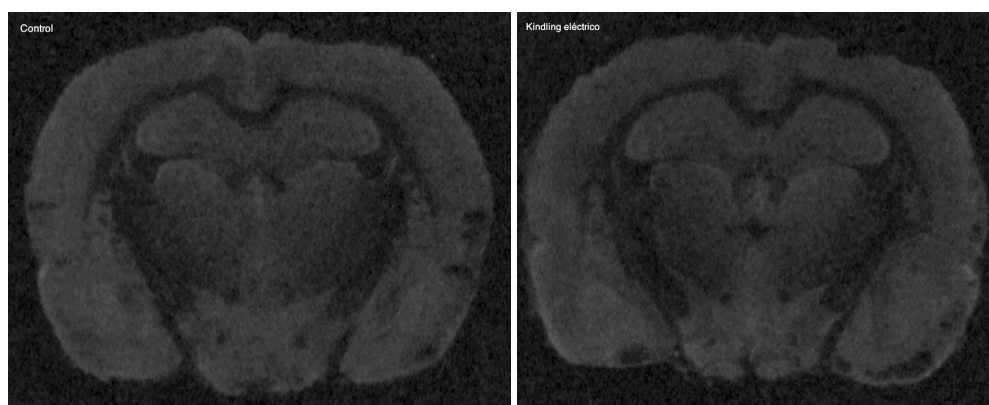


Figura 64. Autorradiografía con 3H-Paroxetina de los grupos control y kindling eléctrico. En ninguna estructura se observan cambios significativos entre ambos grupos experimentales.

Autorradiografía de 3H-Flumazenilo

La autorradiografía con 3H-flumazenilo mostró un descenso de los receptores de benzodiacepinas en el estriado del hemisferio derecho ($p = 0,022$), el contralateral a la posición del electrodo. En la corteza entorrinal se observa un descenso de este tipo de receptores pero únicamente es significativo si se analiza como una única estructura ($p = 0,0498$). Al analizar esta estructura por hemisferios la diferencia no es significativa.

	Derecha		Izquierda	
	control	KE	control	KE
Estriado	36.06 ± 0.73	32.12 ± 1.35*	32.92 ± 1.08	30.69 ± 1.00
Hipocampo dorsal	65.92 ± 2.36	66.09 ± 1.73	65.29 ± 2.43	65.14 ± 1.61
Hipocampo ventral	67.34 ± 0.59	65.05 ± 1.06	66.66 ± 0.44	65.52 ± 0.74
Cortex entorrinal	70.98 ± 1.03	68.80 ± 0.77	69.70 ± 0.88	67.83 ± 0.74
Amígdala	63.51 ± 2.32	63.48 ± 1.15	63.34 ± 2.33	62.38 ± 1.17

Figura 65. Tabla de los resultados del análisis de la autorradiografía con 3H-Flumazenilo de los grupos control y kindling eléctrico. Tanto en corteza entorrinal como en estriado se observa una disminución del marcaje de este ligando en el grupo de kindling eléctrico respecto al control. * $P < 0,05$

4.3.6 Estudios de marcaje con fluoróforos

En los cortes cerebrales de los animales, tanto controles como del grupo de kindling no se observó marcaje con fluorojade en ninguna de las muestras analizadas de diferentes estructuras cerebrales: estriado, ventrículo, hipocampo, rafe y amígdala.

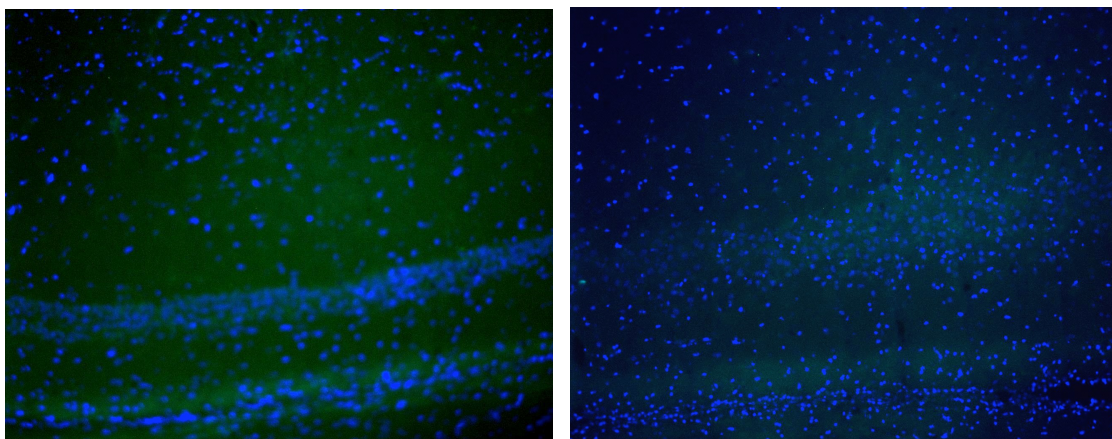


Figura 66. Imágenes fusionadas de la emisión obtenida al excitar a 385 nm (fluorojade) y con luz ultravioleta (DAPI) en el microscopio de epifluorescencia. A la izquierda se observa CA1 de hipocampo dorsal de un animal *sham*. A la derecha, el mismo área de un animal de kindling eléctrico. No se observaron diferencias entre ambos grupos, en los que todos los animales se consideraron negativos para el marcaje con fluorojade.

Sin embargo, las imágenes obtenidas tras la tinción con GFAP mostraron una mayor presencia de células de la glía alrededor del ventrículo en los animales a los que se les había estimulado eléctricamente diariamente hasta alcanzar las crisis convulsivas (figura 67). No se halló diferencia con el grupo control en ninguna otra estructura cerebral.

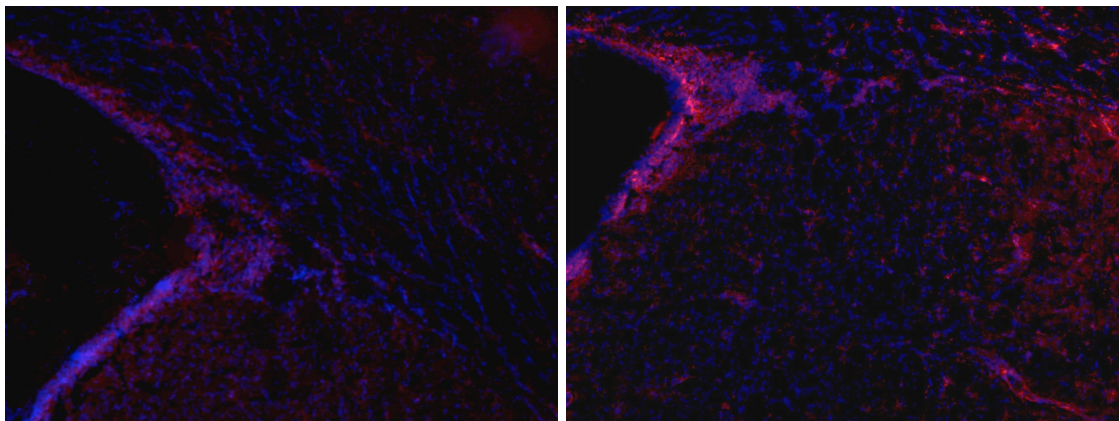


Figura 67. Imágenes de un animal representativo de cada grupo experimental con doble marcaje de fluorescencia GFAP-DAPI. El marcaje con antiGFAP (rojo) muestra una mayor señal en la población de células gliales en los animales del grupo de kindling eléctrico en las paredes del ventrículo (dcha).

Experimento <i>in vitro</i>	Resultados obtenidos en kindling eléctrico
18F-FDG	No se observaron diferencias
18F-MPPF	No se observaron diferencias
3H-AMPA	Receptor AMPA disminuido en estriado
3H-MK801	Menor densidad del receptor NMDA en corteza entorrinal ipsilateral e hipocampo dorsal y estriado en ambos hemisferios
3H-Kainato	
3H-Paroxetina	No se observaron diferencias
3H-Flumazenilo	Disminuida la densidad del receptor de benzodiazepinas en estriado. Sólo significativo en hemisferio contralateral
Fluorojade	Test de neurodegeneración negativo
GFAP	Únicamente se halló gliosis en ventrículo

Figura 68. Tabla resumen de los resultados de los experimentos *in vitro* realizados con los cortes cerebrales de los animales de kindling eléctrico.

4.4 Comparativa entre modelos

4.4.1 Epileptogénesis

Tanto en el protocolo de PTZ agudo como en el kindling eléctrico se consiguió un 100% de éxito en la consecución de crisis convulsivas en los animales. En el caso del kindling químico, no se consiguió que todos los animales alcanzaran las crisis convulsivas. Además, en este modelo fue el único en el que hubo mortalidad derivado de las crisis epileptiformes, así como aparición de *status epilepticus*.

4.4.2 Tratamiento con 8-OH-DPAT

El tratamiento con 8-OH-DPAT tuvo efecto anticonvulsivo en los dos modelos de epileptogénesis con PTZ, el modelo agudo y el modelo de kindling. En estos modelos redujo el número de animales que sufrían crisis convulsivas y la severidad de éstas.

En el modelo de kindling eléctrico el tratamiento con 8-OH-DPAT no tuvo efecto en ninguna de las variables medidas. En este modelo, el tratamiento con el análogo de serotonina no retrasó la aparición de crisis convulsivas ni el nivel comportamental alcanzado en cada sesión.

4.4.3 Estudios de imagen PET

Estudios PET con 18F-FDG

En los estudios de metabolismo cerebral con el radiotrazador 18F-FDG se observó un hipometabolismo producido por las crisis convulsivas que aparecía en los 3 protocolos de epileptogénesis utilizados. Sin embargo, este hipometabolismo era generalizado en el modelo de PTZ agudo, mientras que

en los modelos crónicos (kindling químico y kindling eléctrico) el hipometabolismo era localizado en unas estructuras determinadas.

En los dos modelos de kindling apareció un hipometabolismo en corteza, pero, en el modelo de kindling eléctrico, además observamos un descenso de la captación en el hipocampo, que no se dio en el modelo de kindling químico. Otra diferencia entre ambos modelos de kindling se observó en la protuberancia. En el modelo de kindling PTZ hubo un aumento de captación de 18F-FDG en esta estructura mientras que en los animales sometidos a kindling eléctrico la protuberancia no presentaba diferencia en la captación de este radiotrazador con el grupo control.

Estudios PET con 18F-MPPF

De la misma manera que los estudios con 18F-FDG, el 18F-MPPF tuvo un comportamiento similar en los 3 modelos de epileptogénesis. Tanto en el modelo agudo como en los crónicos hubo un aumento del *binding potential* de este radiotrazador al receptor 5-HT_{1A}. Sin embargo, las estructuras cerebrales en las que el *binding* estaba aumentado no fueron las mismas en cada modelo. En el modelo agudo de PTZ el aumento de *binding* se dio en amígdala, estriado e hipocampo. Sin embargo, en el modelo de kindling con este mismo agente convulsivo únicamente se mantiene el aumento en el hipocampo, sin observarse aumento en amígdala y estriado. Aunque si se observó un aumento en septum con el kindling de PTZ.

En los animales de kindling eléctrico se observó un aumento de *binding potential* del 18F-MPPF en el septum, tal y como se observó en el protocolo de kindling químico. Sin embargo, en el modelo eléctrico no se vio el aumento en hipocampo pero sí un aumento en la corteza entorrinal contralateral al electrodo de estimulación.

Los 3 protocolos de epileptogénesis provocan un aumento de la captación de 18F-MPPF, reflejando una alteración en el sistema serotoninérgico, pero en cada

modelo algunas estructuras afectadas son diferentes de los otros 2 modelos estudiados.

4.4.4 Estudios histoquímicos

Los estudios autorradiográficos con ligandos tritiados mostraron alteraciones similares en los dos modelos de kindling empleados. En ambos modelos encontramos un aumento de los receptores glutamatérgicos tipo AMPA.

Los receptores glutamatérgicos tipo NMDA estaban alterados en ambos modelos. Sin embargo, mientras que en el kindling químico estaban aumentados en corteza, en el kindling eléctrico estaban reducidos en diversas estructuras cerebrales.

Los receptores de glutamato tipo kaínico no estaban modificados tras el kindling con PTZ, pero en el kindling eléctrico se encontró que estaban reducidos en la amígdala ipsilateral. También se encontraron diferencias entre ambos protocolos en la población de receptores de benzodiazepinas. En el modelo de kindling químico no se vio ninguna alteración de estos receptores, mientras que en el eléctrico se encontraban disminuidos en el estriado contralateral a la estimulación.

El recaptador de serotonina, estudiado con el ligando 3H-paroxetina, no se vio alterado en ninguno de los modelos de kindling.

El marcaje de neurodegeneración con fluorojade resultó negativo en los modelos de kindling en todas las zonas analizadas. Sin embargo, en los estudios de gliosis sí se observaron diferencia entre ambos protocolos de kindling. En el kindling químico con PTZ no se observó gliosis tras las crisis convulsivas, pero en el kindling eléctrico se observó marcaje con GFAP únicamente en la pared del ventrículo cerebral en los animales estimulados.

5. Discusión

5.1 MODELO DE PTZ AGUDO

El modelo de epilepsia inducido por PTZ, un antagonista de GABA, es uno de los modelos de epilepsia más aceptados y reproducidos en diferentes laboratorios. Este modelo está reconocido clásicamente como un modelo de epilepsia generalizada (Ono. et al., 1990). Además se sabe que el modelo de PTZ no genera muerte neuronal en animales adultos (Pineau et al., 1999), tiene una dosis respuesta fácilmente identificable (Gilber y Goodman, 2006) y una respuesta comportamental y electroencefalográfica característica (Ono et al., 1990).

5.1.1 Evaluación del modelo

La efectividad de la inducción de crisis convulsivas generalizadas en nuestro experimento fue del 100%. Todos los animales a los que se les administró el PTZ según este protocolo sufrió crisis convulsivas, evaluando tanto el comportamiento como el registro neurofisiológico realizado en la zona CA1 del hipocampo dorsal. Por ello, este modelo se considera un modelo válido de crisis epilépticas generalizadas.

5.1.2 Tratamiento con 8-OH-DPAT

En animales pretratados con 8-OH-DPAT, el porcentaje de animales que alcanzaban crisis convulsivas disminuyó hasta el 75%. Además, el pretratamiento con el agonista de 5-HT_{1A} redujo la duración de las crisis convulsivas, así como la intensidad de éstas. Esto demuestra que la activación del receptor de serotonina 5-HT_{1A} mediante el agonista 8-OH-DPAT reduce la intensidad de las crisis e, incluso, evita estas crisis tras la aplicación de un antagonista de GABA, como es el PTZ. Este efecto es perceptible tanto en el

comportamiento del animal como en la actividad electroencefalográfica, observándose una disminución en la frecuencia de descarga de puntas epileptiformes en el registro cuando se compara con el grupo al que se administró PTZ.

El 8-OH-DPAT actúa sobre receptores postsinápticos 5-HT_{1A} produciendo una respuesta inhibitoria a través de una hiperpolarización de la membrana producida por la apertura de canales de potasio (Salgado y Alkadhi, 1995; Barnes y Sharp, 1999; Lanfumey y Hamon, 2000; Aznavour y Zimmer, 2007). Esta hiperpolarización tiene un efecto inhibitorio en las neuronas piramidales del hipocampo, reduciendo así su actividad. Este efecto inhibitorio reduce la activación de este tipo de neuronas debido al bloqueo del sistema gabaérgico inducido por la administración de PTZ.

5.1.3 Estudios de imagen

Estudios con 18F-FDG

En los estudios en los que se les inyectó una dosis de 70 mg/kg de PTZ a los animales antes de realizar el estudio PET se observó un descenso generalizado en la captación de 18F-FDG cerebral respecto a sus estudios controles, en los que se les había administrado únicamente suero salino. Esta menor captación refleja un hipometabolismo generalizado en las estructuras cerebrales estudiadas tras la administración del proconvulsivante y después de la aparición de una crisis convulsiva.

Sin embargo, al realizar estudios dinámicos de la captación de 18F-FDG, lo que permite analizar el curso temporal de los efectos de la administración de PTZ, se observó un aumento en los valores de entrada de glucosa en la célula en los minutos siguientes a la inyección de PTZ. Este aumento sólo fue significativo en el estriado aunque el aumento de la velocidad de entrada a la célula fue generalizado. Este hecho muestra un mayor requerimiento de

glucosa de las células cerebrales tras la administración de PTZ respecto a los mismos animales cuando solo se les administró salino por vía intraperitoneal.

Los estudios estáticos, por su parte, revelan la captación total del radiotrazador a lo largo de todo el tiempo de estudio. En este caso, nuestros estudios estáticos muestran la captación durante la crisis convulsiva y la posterior depresión postictal. Dado que la duración es mucho mayor en la depresión postictal comparado con la fase ictal, el hipometabolismo visto en estos estudios refleja el bajo consumo de glucosa de las células cerebrales durante este periodo. Por su parte, el aumento del metabolismo durante la fase ictal no lo podemos apreciar en los estudios estáticos debido a su corta duración respecto al tiempo total de estudio.

Los resultados en los estudios dinámicos apoyan esta hipótesis. Estos estudios reflejan la cinética de entrada de glucosa en la célula. El aumento de esta constante en los animales tratados con PTZ respecto a sus estudios control manifiesta un mayor requerimiento de glucosa durante la fase ictal.

Del mismo modo, los datos obtenidos de los estudios con 18F-FDG reflejan un patrón de actividad neuronal similar al observado en los registros eléctricos adquiridos con este modelo. Se observa un aumento de actividad eléctrica durante la fase ictal y, posteriormente, una depresión postictal durante la cual la actividad eléctrica está muy por debajo de la actividad basal, por lo que su gasto energético también es inferior que en el estado basal.

El patrón de actividad observado tanto en los estudios metabólicos con el microPET como en los registros eléctricos se asemejan a la actividad obtenida *in vitro* con el modelo de otro antagonista gabaérgico, la bicuculina. En este modelo se observan descargas sincrónicas que tras unos minutos dan paso a una depresión postictal, en la que la actividad es menor que la basal (Bucket, 1979; Uemura y Kimura, 1988; Uva et al., 2005).

Estudios con 18F-MPPF

En los estudios con el radiotrazador 18F-MPPF se observó un aumento del *binding potential* tras las crisis producidas por la administración de PTZ. Estas diferencias se observaron en hipocampo, estriado y amígdala, sin diferencias interhemisféricas.

En las autorradiografías con este radiotrazador se observaron diferencias entre el grupo de PTZ y el control. La densidad de receptores de serotonina 5-HT_{1A} en el giro dentado fue superior en los animales tratados con PTZ que en los animales control.

La cuantificación *in vivo* de receptores mediante radiotrazadores es mucho más compleja que las medidas *in vitro* y asumiendo algunas de las siguientes limitaciones:

1. La administración del radiotrazador es intravenosa y no directamente sobre la diana, por lo que la unión del trazador esta influenciada por el paso de membrana y por el aclaramiento periférico.
2. La actividad medida es la total del tejido, incluyendo la unión específica, la inespecífica y trazador libre. Estimar la proporción que corresponde a cada fracción necesita de complejos modelos matemáticos.
3. La resolución espacial de los escáneres PET es limitada.

Sin embargo, pese a estas limitaciones, esta técnica ofrece una alta sensibilidad y permite la cuantificación no sólo de la densidad de receptores, si no , también, de la función de éstos. Los estudios *in vivo* con esta técnica permiten evaluar metabolismo o receptores en su propio medio natural y en estudios longitudinales.

El parámetro más utilizado para la cuantificación de receptores es el *binding potential*, que es el producto de la densidad de receptor y la afinidad de éste por el radiotrazador. Un aumento de este parámetro puede reflejar tanto un

incremento de la densidad del receptor o que la densidad no varíe pero aumente la afinidad de éste por el trazador o disminuya el ligando endógeno del receptor (Fumita e Innis, 2002).

El aumento de la densidad óptica observada en los estudios autorradiográficos apunta a que el aumento en *binding potential* en los estudios PET con 18F-MPPF es debido a un aumento de la densidad de receptores 5-HT_{1A}.

5.2 MODELO DE KINDLING CON PTZ

El modelo de kindling con PTZ es uno de los mayor aceptación en la investigación de la epilepsia. Sin embargo uno de los obstáculos que se presenta con este modelo es la variabilidad biológica, que conlleva que algunos animales no alcancen el estado de kindling tras varios días de administración del fármaco.

5.2.1 Evaluación del modelo

En nuestro estudio con este modelo obtuvimos un porcentaje de animales que alcanzaron el kindling cercano al 80%. Nuestros resultados no fueron diferentes a los descrito por otros laboratorios tras 18 sesiones de administración de PTZ (6 semanas).

Otra faceta problemática de este modelo está relacionada con la mortalidad por *status epilepticus*, el cual es generado por la acumulación de fármaco en el animal debido a las continuas aplicaciones diarias de PTZ. Nuestro protocolo indujo una mortalidad del 20%

Tanto la mortalidad como la tasa de animales kindled observadas con nuestro protocolo es similar a las descritas por otros grupos que utilizaron el PTZ como agente proconvulsivante (Corda et al., 1991; Corda et al., 1992; Fischer y Kittner, 1998).

La proporción de animales que alcanzan el estado de kindling con este protocolo mediante el PTZ es baja comparada con otros protocolos, sobre todo con el kindling eléctrico. Este bajo rendimiento se puede atribuir tanto a los animales resistentes al kindling como al elevado índice de mortalidad producida por *status epilepticus*.

5.2.2 Tratamiento con 8-OH-DPAT

El efecto del agonista de serotonina, 8-OH-DPAT, se manifestó en la tasa final de animales que alcanzaron el kindling, reduciéndola en un 16,6% del total de animales tras el mismo número de administraciones de PTZ en ambos grupos. Esto señala que el sistema serotoninérgico estaría implicado en el inicio de la crisis o la generalización de ésta, por lo que la activación de los receptores 5-HT_{1A} por el 8-OH-DPAT reduce la intensidad de las crisis y, por lo tanto, el número de animales que alcanzan las crisis tónico-clónicas en 3 sesiones consecutivas es menor cuando se pretratan con este fármaco.

El pretratamiento con el agonista de 5-HT_{1A} no disminuyó la tasa de mortalidad de este protocolo, al no ser capaz este agonista de evitar la aparición del *status epilepticus* en los animales ni de reducir su duración o su severidad lo suficiente como para disminuir la mortalidad que produce este fenómeno.

Otro efecto observado tras la administración de este fármaco fue la ralentización de la ganancia de peso tanto en los animales tratados con PTZ como en los del grupo control con 8-OH-DPAT y salino. Esta menor ganancia de peso es visible desde la primera administración del agonista de 5-HT_{1A}. La pérdida o no ganancia de peso de los animales debido al tratamiento con el 8-OH-DPAT ya se ha observado en otros grupos previamente (López-Meraz et al., 2005). También se observó la aparición de las características comportamentales del síndrome serotoninérgico, tal como se ha descrito por otros grupos (Goodwin et al., 1987; Yamada et al., 1988; Wieland et al., 1989; Watanabe et al., 1998; Khan et al., 2001). El comportamiento de los animales derivado de la administración del agonista de serotonina sirvió como control de que el tratamiento con 8-OH-DPAT tenía efecto en el sistema serotoninérgico.

5.2.3 Estudios de imagen con microPET

Estudios con 18F-FDG

En los estudios PET de metabolismo cerebral con 18F-FDG, se observó un aumento de la captación de este análogo de la glucosa en la protuberancia y un descenso en la corteza de los animales de kindling, respecto al grupo control. Al dividir el grupo experimental en dos subgrupos, separando los animales que habían alcanzado el kindling en las 18 sesiones de los que no, se detectaron diferencias en la captación a nivel de corteza cerebral. Los animales kindling positivo presentaron un hipometabolismo en la corteza respecto al grupo control y al subgrupo de animales kindling negativo, aunque únicamente era estadísticamente significativo respecto a este último. Este hipometabolismo ya era visible tras las 5 primeras inyecciones de PTZ y, además, en este punto temporal, era significativo tanto respecto al grupo control como al de animales kindling negativo.

El hipometabolismo temprano observado en la corteza en los animales kindling positivo muestra que la imagen PET-FDG presenta una mayor sensibilidad para evaluar alteraciones en el cerebro de estos animales respecto a la evaluación comportamental, ya que, las diferencias metabólicas aparecen antes que las comportamentales. El subgrupo resistente mantiene una captación similar al grupo control y superior al del subgrupo de animales *kindled*. El hipometabolismo cortical que muestran los animales que posteriormente alcanzarán kindling reflejaría los cambios que este protocolo está produciendo en la funcionalidad de su corteza cerebral y que, en principio, no se están dando en el subgrupo de animales resistentes.

En los dos subgrupos (kindling positivo y kindling negativo), se identificó un hipermetabolismo en la protuberancia. Este resultado pudiera sugerir una activación de regiones como el *locus coeruleus* en respuesta al modelo de kindling de PTZ. El *locus coeruleus* se ha visto que está implicado en las crisis epilépticas provocadas por PTZ, ya que es el responsable de la innervación

noradrenérgica de estructuras como el hipocampo y la corteza, implicadas en este modelo de epileptogénesis (Oishi y Suenaga, 1982; el Hamdi et al., 1992; Silveira et al., 1998; Felippotti et al., 2011). Se ha propuesto que la activación del *locus coeruleus* y la consiguiente liberación de noradrenalina sería el mecanismo de acción de la estimulación del nervio vago en pacientes con epilepsia refractaria (Ramani, R., 2008; Fornai et al., 2011).

Estudios con 18F-MPPF

En los estudios de imagen PET con el radiotrazador 18F-MPPF se observó un aumento del *binding potential* en el grupo de kindling respecto al grupo control. Este aumento fue más acentuado en el septum y el hipocampo. Sin embargo, al analizar la autorradiografía *ex vivo* con este mismo radiotrazador, no se aprecian diferencias entre ambos grupos experimentales en la densidad de receptor de serotonina 5-HT_{1A}.

Uno de los hallazgos llamativos de nuestro trabajo ha sido la discrepancia entre resultados *in vivo* e *in vitro* en relación a los estudios de binding con el receptor de serotonina 5-HT_{1A}. Una de las posibles interpretaciones podría ser que el aumento del *binding potential* del receptor 5-HT_{1A} en los estudios *in vivo* con 18F-MPPF refleje un cambio funcional de estos receptores o una depleción de la serotonina endógena que no se observa en la autorradiografía. Además, los estudios con anticuerpo antiGFAP no mostraron diferencias entre ambos grupos experimentales. Por lo tanto, el aumento del *binding potential* de 18F-MPPF tampoco puede ser atribuido a un proceso inflamatorio generado por las crisis convulsivas sufridas por estos animales.

5.2.4 Estudios autorradiográficos con ligandos tritiados

Al analizar las autorradiografías de receptores glutamatérgicos se observaron diferencias entre el grupo control y el grupo de kindling. En el grupo de animales a los que se les administró PTZ se encontró un aumento en la población de receptores tipo AMPA en el hipocampo ventral y en la corteza entorrinal. Estos resultados coinciden con los observados por Ekonomou et al. (2001). En la corteza entorrinal también se observó un aumento en la densidad de receptores tipo NMDA. Sin embargo, los receptores de kainato no se vieron modificados por el kindling químico con PTZ.

El aumento de la población de receptores glutamatérgicos se corresponde con un aumento de la excitabilidad neuronal de los animales que son sometidos a kindling. El aumento de los receptores NMDA ya se ha observado en otros modelos animales, así como en pacientes epilépticos (Morimoto et al., 2004; Cremer et al., 2009). También se han observado modificaciones en los receptores del tipo AMPA tras las crisis epilépticas en el modelo de pilocarpina (Hu et al., 2012; Rajasekaran et al., 2012).

Por otro lado, no se hallaron diferencias en la población de receptores de benzodiazepinas. Este hecho ya había sido observado anteriormente en un estudio similar realizado por Cremer et al. (2009) en el que tampoco observaron alteraciones en la población de este tipo de receptor excepto en el giro dentado del hipocampo.

5.2.5 Estudios de histoquímica

Los estudios con fluorojade en las muestras cerebrales de animales sometidos a kindling químico confirmaron la ausencia de neurodegeneración en este modelo de crisis convulsivas. Además, las pruebas inmunohistoquímicas con GFAP no mostraron diferencias con los animales controles. Estos datos indican una ausencia de daños celulares debidos al protocolo, como ya había sido observado por otros autores (Morimoto et al., 2004).

5.3 MODELO KINDLING ELÉCTRICO

El kindling eléctrico es el tipo de kindling más frecuentemente utilizado. Este modelo de kindling ha sido muy estudiado como modelo de epilepsia de crisis complejas parciales con generalización secundaria. Este tipo de epilepsia temporal es el más refractario a la terapia con fármacos antiepilépticos. Todas las especies animales sometidas al protocolo de kindling eléctrico han desarrollado crisis convulsivas (McNamara, 1984; Loscher 1993; McIntyre, 2006; Sutula y Ockuly, 2006). Además, es un modelo de epilepsia en el que el desarrollo de la actividad epileptiforme se da con ausencia de un daño morfológico grave (Morimoto et al, 2004).

5.3.1 Evaluación del modelo

Una de las dificultades metodológicas de este modelo es la implantación de electrodos. El mal emplazamiento de éstos, comprobado por estudios histológicos, provoca el descarte de animales una vez finalizado el protocolo. En nuestro trabajo, este problema se ha resuelto mediante la utilización del CT tras la cirugía, junto con las imágenes de resonancia magnética obtenidas antes de implantar los electrodos, que nos reveló la localización del electrodo en cada animal. Esto permitió descartar a los animales mal implantados o dudosos (20-25% de los animales) previo al inicio del protocolo de estimulación eléctrica repetida y a la detección del umbral de postdescarga, a diferencia de la metodología común, en la que se descartan los animales una vez terminado el protocolo de kindling eléctrico y ya sacrificados los animales.

Por lo tanto, el uso del tomógrafo fue de gran utilidad en la correcta implantación de los electrodos aumentando el porcentaje de éxito del protocolo de kindling, siendo cercano al 100% (únicamente se consideraron no kindled los animales que presentaron la desinserción del electrodo durante el protocolo).

Los animales sometidos al protocolo de kindling eléctrico para generar crisis convulsivas en nuestro laboratorio necesitaron un promedio de 17 sesiones para alcanzar el estadio 5 de la escala comportamental de Racine (Racine 1972a, 1972b). Este valor no difiere de lo observado en otros grupos que han utilizado este protocolo en esta misma cepa de ratas o en otras diferentes (Racine, 1972b; Watanabe et al., 1998).

5.3.2 Tratamiento con 8-OH-DPAT

A diferencia del grupo control, la mitad de los animales pretratados con el agonista de 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT no mostraron una postdescarga tras un estímulo 50 μ A por encima de su umbral (calculado en ausencia de este agonista). Sin embargo, tras 5 sesiones (1 semana) todos los animales presentaron postdescarga, por lo que el efecto producido por el 8-OH-DPAT había desaparecido. Varios grupos han observado este mismo efecto con agonistas de serotonina administrados previamente a la estimulación. En todos los casos y de forma similar a nuestro experimento, el efecto protector de estos fármacos desaparecía tras las primeras sesiones (Cagnotto et al., 1998; Watanabe et al., 1998).

Sin embargo, una vez que todos los animales de este grupo experimental presentaban una postdescarga como respuesta al estímulo, la duración de la misma fue más acentuada que en el grupo de kindling eléctrico llegando incluso a duplicarla. Posteriormente, la duración de la respuesta se estabilizó, mientras que el grupo de kindling eléctrico continuó aumentando progresivamente hasta alcanzar una duración similar en ambos grupos.

Además de la duración, se analizó la progresión de la frecuencia de disparo de la población de neuronas próximas al electrodo. En este aspecto tampoco se observaron diferencias entre ambos grupos y tampoco se vio una variación durante las diferentes sesiones de estimulación, manteniéndose la frecuencia de disparo de la postdescarga estable durante todo el protocolo.

En ninguno de los aspectos estudiados de la respuesta electrofisiológica al estímulo se ha observado una correlación con la evolución comportamental de los animales durante el protocolo de kindling eléctrico.

En general, la administración previa del agonista del receptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, no modificó la respuesta al estímulo, la evolución comportamental de los animales a lo largo del tiempo ni el porcentaje de éxito del protocolo de kindling eléctrico. Pese a que este fármaco sí se ha observado que tiene características protectoras en otros modelos animales de epilepsia, como el modelo de crisis agudas con PTZ y el modelo de *status epilepticus* con ácido kaínico (López-Meraz et al., 2005), en el modelo de kindling eléctrico parece no tener dicho efecto en nuestro caso y tampoco en otros estudios publicados (Watanabe et al., 1998; López-Meraz et al., 2005).

5.3.3 Estudios de imagen con flúor-18

Estudios con 18F-FDG

La evaluación del metabolismo cerebral en este modelo de epileptogénesis mostró diferencia entre los animales *kindled* y sus controles. La estimulación diaria hasta alcanzar las crisis convulsivas provocó un hipometabolismo tanto en la corteza del hemisferio derecho como en el estriado. La aparición de cambios en el hemisferio contralateral a la estimulación señala que para la consecución de crisis convulsivas generalizadas con este modelo es necesario el reclutamiento de otras estructuras contralaterales, además de la estimulada, fenómeno que se ha descrito con anterioridad como transferencia positiva (Engel et al., 1978). Sin embargo, en la estructura estimulada no se observan cambios metabólicos respecto a los animales *sham*, hecho ya observado en el único estudio publicado de PET con este modelo, en el que la estructura estimulada era la amígdala (Jupp et al., 2007).

Los estudios autorradiográficos realizados *ex vivo* con 18F-FDG en estos mismos animales mostraron unos resultados semejantes a los obtenidos *in vivo* mediante el tomógrafo PET/CT.

Estudios con 18F-MPPF

En este modelo de epileptogénesis observamos una alteración del sistema serotoninérgico mediante los estudios PET dinámicos con el radiotrazador 18F-MPPF. El estudio del *binding potential* de este radiofármaco en los dos grupos experimentales mostró un aumento de la captación en los animales *kindled* respecto a los animales *sham* tanto en septum como en la corteza entorrinal contralateral una vez finalizado el kindling eléctrico.

Sin embargo, de igual forma que en el modelo de kindling químico, en los estudios con este radiotrazador del receptor 5-HT_{1A} *ex vivo* no se observó ninguna diferencia entre ambos grupos, descartando el cambio en la densidad de este receptor de serotonina como causa de las diferencias observadas en los estudios dinámicos con microPET (ver discusión en el apartado 5.4.2).

5.3.4 Estudios autorradiográficos con ligandos tritiados

En los estudios de receptores de glutamato se observaron diversas alteraciones en los diferentes tipos de receptor. Las autorradiografías de 3H-AMPA mostraron diferencias entre ambos grupos únicamente en el estriado, donde la densidad de este tipo de receptor es menor en los animales *kindled*. En los estudios publicados no se había observado ninguna diferencia en este tipo de receptor glutamatérgico tras el protocolo de kindling eléctrico (Vezzani et al., 1990; Akiyama et al., 1992). Los receptores de tipo NMDA se vieron disminuidos en los animales de kindling eléctrico en la corteza entorrinal del hemisferio izquierdo y en el estriado y el hipocampo dorsal de ambos hemisferios. La mayor parte de los estudios publicados no muestran un cambio en este tipo de receptor tras el kindling eléctrico (Vezzani et al., 1990; Akiyama

et al., 1992). Sin embargo sí se han observado cambios en la proporción de la subunidades de este receptor que pueden afectar a su funcionalidad. En este aspecto se han publicado datos contradictorios o ambiguos (Morimoto et al., 2004). En el caso de los receptores de kainato, se observó una tendencia similar a los otros receptores de glutamato. El kindling eléctrico disminuyó su densidad en todas las estructuras estudiadas, aunque únicamente fue significativo este descenso en la amígdala del hemisferio ipsilateral. Este descenso generalizado de la densidad de receptores glutamatérgicos podría reflejar un mecanismo compensatorio endógeno debido al aumento de excitabilidad provocado por el kindling eléctrico.

Al evaluar el sistema de recaptación de serotonina no se observaron cambios significativos en ninguna de las estructuras estudiadas. Este estudio, junto con la autorradiografía con 18F-MPPF, muestran que el kindling no modifica ni la densidad de receptores 5-HT_{1A} ni los recaptadores de serotonina libre.

Al contrario que en el kindling químico con PTZ, en los animales sometidos al kindling eléctrico se encontraron alteraciones en los receptores de benzodiazepinas. En el grupo de animales *kindled* se observó un descenso de este tipo de receptores en el estriado y en la corteza entorrinal. El estudio de este tipo de receptor tras el protocolo de kindling eléctrico ha generado diferentes resultados. Se ha publicado un aumento de receptores de benzodiazepinas en amígdala e hipocampo (Tuff et al., 1983), descenso en hipocampo (Titulaer et al., 1994) y ausencia de modificaciones en la población de receptores (Shin et al., 1985).

5.3.5 Estudios de histoquímica

Los estudios de marcaje con fluorojade descartaron la presencia de neurodegeneración en los animales sometidos al kindling eléctrico. Además, los ensayos de inmunofluorescencia con antiGFAP mostraron ausencia de inflamación en todas las estructuras estudiadas de estos animales excepto en el ventrículo, descartando así además que el aumento de *binding potential* del

18F-MPPF fuese debido a una gliosis reactiva (Aune et al., 1993; Iken et al., 1995; Freire-Garabal et al., 2003). El aumento de señal de GFAP en ventrículo ya ha sido descrito anteriormente en el kindling eléctrico estimulando en amígdala (Miyazaki et al., 2003).

5.4 Comparativa entre los modelos de epileptogénesis

5.4.1 Evaluación de los modelos

En ninguno de los modelos animales de epilepsia empleados en este trabajo se ha observado daño neuronal producido por el protocolo empleado ni por las crisis epilépticas generadas. En el caso del modelo agudo con PTZ está ampliamente descrita la ausencia de muerte neuronal con el protocolo aquí empleado (Morimoto et al., 2004; Velisek, 2006; Gilbert y Goodman, 2006). En el caso de los modelos crónicos de kindling, con PTZ y eléctrico, se comprobó la ausencia de daño neuronal producido en los animales sometidos a estos protocolos mediante marcaje con fluorojade. En ninguna de las muestras analizadas de ambos protocolos se observó un marcaje con este fluoróforo que indicaría la presencia de neurodegeneración. Estos resultados confirman lo hallado en estudios anteriores de otros grupos (Morimoto et al., 2004; McIntyre, 2006). Únicamente se ha observado marcaje positivo con GFAP en la pared del ventrículo de los animales sometidos a kindling eléctrico, resultado ya descrito anteriormente (Miyazaki et al., 2003).

5.4.2 Estudios de imagen con microPET

Estudios con 18F-FDG

Los estudios metabólicos con 18F-FDG muestran un comportamiento similar en los tres modelos. En el caso del modelo agudo con PTZ se produjo un aumento de la captación de este radiotrazador en el momento de la crisis epiléptica, observado en los estudios dinámicos. Posteriormente, en los estudios estáticos obtuvimos una menor captación del análogo de glucosa en los animales a los que se les había administrado la dosis convulsiva de PTZ. Igualmente, en los modelos crónicos se observó un descenso de la captación de 18F-FDG en los animales sometidos al protocolo de kindling, ya fuera químico o eléctrico.

En el caso de los animales con crisis epilépticas agudas, el hipometabolismo posterior a la crisis epiléptica fue generalizado, encontrando diferencias significativas en la mayoría de las estructuras cerebrales analizadas. Sin embargo, en los modelos crónicos, el hipometabolismo no era generalizado. En ambos modelos de kindling se encontró un hipometabolismo marcado en la corteza cerebral, aunque en el modelo de kindling eléctrico era mayor en el hemisferio contralateral al electrodo de estimulación.

Tanto en el modelo agudo como en los crónicos, todos los animales que sufren las crisis convulsivas presentan hipometabolismo. El hipometabolismo en determinadas áreas cerebrales se ha encontrado en diferentes modelos animales de epilepsia. Guo et al. (2009) hallaron un descenso del consumo de glucosa generalizado en la fase latente tras la administración de pilocarpina que únicamente se mantenía en hipocampo y tálamo en la fase crónica. Goffin et al. (2009) publicaron resultados similares también con el modelo de pilocarpina. Por su parte, Jupp et al. (2007, 2012) también obtuvieron los mismos resultados al tratar a los animales con ácido kaínico y kindling eléctrico en amígdala respectivamente.

Los resultados de estos grupos se asemejan a los obtenidos en nuestros estudios. Tanto en esos estudios como en el nuestro, los animales muestran un hipometabolismo respecto a los grupos controles. El hipometabolismo observado en el modelo de pilocarpina es generalizado en la fase temprana del protocolo y posteriormente, se reduce a determinadas estructuras cerebrales. Este hecho concuerda con nuestros datos. En el modelo agudo obtuvimos un hipometabolismo cerebral generalizado mientras que en los modelo de kindling, el hipometabolismo se reduce únicamente a la corteza cerebral.

Sin embargo, en los estudios mencionados antes los modelos utilizados para inducir la epileptogénesis son modelos de *status epilepticus*, que se sabe que provocan muerte neuronal (Sloviter, 2008; O'Dell et al., 2012). El hipometabolismo observado en esos estudios sería, en parte, debido a esa pérdida neuronal. Sin embargo, estos autores han señalado que el descenso

de metabolismo no es proporcional con la cantidad de neuronas perdidas, por lo que atribuyen parte de ese hipometabolismo a un descenso de la actividad neuronal u otros mecanismos subyacentes durante la epileptogénesis (Guo et al., 2009; Jupp et al., 2012). En los protocolos empleados en nuestro estudio no hemos observado ninguna señal de daño neuronal en los estudios inmunohistoquímicos realizados con fluorojade y marcaje de GFAP. Además, otros grupos han reportado la ausencia de daño morfológico tras el kindling (Morimoto et al., 2004).

Se ha demostrado una fuerte relación entre el hipometabolismo en hipocampo posterior al insulto epileptogénico en el modelo de ácido kaínico y la expresión del transportador GLUT-1 y un marcador de sinaptogénesis, la sinaptofisina. Goffin et al. (2008) hipotetizan que este metabolismo puede ser debido a una inhibición en las áreas de propagación de la crisis como posible mecanismo de defensa. Esto indicaría que el hipometabolismo es resultado de alteraciones que contribuyen a los procesos de epileptogénesis (Jupp et al., 2012).

El hipometabolismo observado en pacientes de TLE no sólo se asocia con la pérdida neuronal en el foco, también se atribuye al efecto de volumen parcial debido a la atrofia y a la desaferentación (Chinvarun, 2013). Lamusuo et al. (2001) no encontraron correlación entre el hipometabolismo y el daño neuronal en pacientes de TLE.

Estudios con 18F-MPPF

Por su parte, el aumento del *binding potential* del radiotrazador 18F-MPPF se ha observado en los tres modelos animales utilizados. Tanto en el modelo agudo de crisis epilépticas como en los dos modelos de epileptogénesis por kindling, eléctrico y con PTZ.

En el modelo agudo con PTZ también se observó un aumento del marcaje con 18F-MPPF in vitro. Esto señala que el aumento de binding potential visto en los

estudios *in vivo* en este modelo es debido al aumento de la población del receptor de serotonina 5-HT_{1A}.

Sin embargo, en los estudios autorradiográficos de los modelos de kindling no se observa ninguna diferencia. Esto indica que las crisis epilépticas provocan cambios en el sistema serotoninérgico en varias estructuras cerebrales durante el kindling independientemente de la naturaleza del insulto. Mediante la inmunofluorescencia con antiGFAP se descartó que este aumento de *binding* fuese como consecuencia de una gliosis reactiva en lugar de ser debida al sistema serotoninérgico.

Van Bogaert et al. (2001) presentaron un estudio en el que también analizaban la población de receptores 5-HT_{1A} en un modelo animal de epilepsia. En este experimento hallaron una reducción del *binding potential* de este radiotrazador respecto a los animales controles que atribuyeron a la muerte neuronal producido por el ácido kaínico. A diferencia del modelo utilizado por van Bogaert, ninguno de los tres modelos que hemos utilizado en este estudio provocó muerte neuronal, por lo que no pueden ser comparables los resultados.

Los datos obtenidos con el 18F-MPPF *in vivo* en todos los modelos utilizados son contrarios a lo observado en humanos. En los pacientes de TLE sometidos a un escáner PET con radiofármacos específicos del receptor 5-HT_{1A} se obtienen unos valores de *binding potential* menores que en los sujetos controles (Merlet et al., 2004; Savic et al., 2004; Didelot et al., 2008; Assem-Hilger et al., 2010; Didelot et al., 2010; Theodore et al., 2012). Sin embargo en nuestros experimentos el *binding potential* aumenta en los animales con crisis epilépticas. Esta diferencia puede ser debida a que los pacientes analizados en estos estudios han padecido la enfermedad durante años presentando esclerosis en el foco epiléptico, que es la principal causa de la disminución del *binding potential* observada. En nuestro trabajo, los animales se encuentran en un curso temporal de la epilepsia diferente a los pacientes. Mientras que los pacientes analizados se encuentran en la fase crónica de la enfermedad, nuestros animales están en la fase de epileptogénesis, que en humanos se

corresponde con una fase silente sin manifestaciones clínicas. Además, los animales sometidos a nuestros protocolos no presentan daño neuronal, por lo que no hay pérdida de neuronas serotoninérgicas que produzca un descenso en el *binding potential*, hecho que sí aparece en los estudios de van Bogaert con el modelo de ácido kaínico.

Además, los estudios *in vitro* en los modelos de kindling muestran que la población de receptores 5-HT_{1A} no está afectada. En los estudios *in vivo*, además de la densidad de receptores, la afinidad de éstos por su ligando y la cantidad de ligando endógeno pueden afectar al *binding* del radiotrazador. Un aumento del *binding potential* en los estudios PET *in vivo* puede reflejar tanto un aumento de la densidad de receptores como estabilidad en el número de receptores que tiene una mayor afinidad por el ligando o una depleción del ligando endógeno (Fumita e Innis, 2002). Puesto que en los estudios *in vitro* de los modelos animales de epileptogénesis con kindling vimos que no había cambios en la densidad de receptores, el aumento del *binding potential* observado en éstos se puede deber a un cambio en la afinidad de los receptores de serotonina 5-HT_{1A} por sus ligandos o a una depleción de la serotonina endógena.

En estudios con el modelo de *status epilepticus* con pilocarpina se observó un aumento de serotonina en el momento de la crisis. En los días posteriores la serotonina libre en el hipocampo descendió un 48% y se mantuvo en niveles inferiores al basal cuando aparecieron las crisis espontáneas (Lin et al., 2007). Zimmer et al. (2003) observaron que tras la depleción de serotonina aumentaba el *binding potential* del 18F-MPPF en el hipocampo. Teniendo en cuenta estos datos, el aumento del *binding potential* observado en los modelos de kindling podría deberse a una depleción de la serotonina endógena debida a la aparición de crisis convulsivas, facilitando la unión del 18F-MPPF al receptor 5-HT_{1A}.

5.4.3 Efecto de la serotonina a través del receptor 5-HT_{1A} en la epileptogénesis

En el modelo agudo con PTZ observamos un aumento de la densidad de receptor 5-HT_{1A} tanto en los estudios *in vivo* como en los estudios de autorradiografía. Este aumento reflejaría una activación del sistema serotoninérgico en respuesta a la actividad ictal provocada por la administración de PTZ. El aumento del *binding potential* del MPPF mostraría una up-regulation del receptor en respuesta al estímulo epileptogénico. La serotonina liberada actuaría a través del receptor 5-HT_{1A} hiperpolarizando a las neuronas piramidales del hipocampo y evitando la actividad epileptogénica. Por ello, el pretratamiento con 8-OH-DPAT en este modelo tiene un efecto anticonvulsivo, reduciendo sensiblemente tanto el número de crisis como la duración y la severidad de éstas.

Sin embargo, en los modelos de kindling, tanto eléctrico como químico, no se observaron alteraciones en la densidad de receptores de serotonina 5-HT_{1A} medidos con autorradiografía de 18F-MPPF. Esta diferencia con el modelo agudo de PTZ explicaría la diferente respuesta de los animales de kindling al pretratamiento con 8-OH-DPAT, ya que este fármaco únicamente tenía efecto en los primeros días del protocolo que desaparecía en la fase crónica.

Estos hechos señalarían a un efecto protector del sistema serotoninérgico, a través del receptor 5-HT_{1A}, el cual se activa en respuesta al estímulo epileptogénico, como hemos visto en los experimentos con 18F-MPPF. Sin embargo, este papel protector no sería efectivo una vez superada la fase aguda, debido probablemente al escaso efecto del receptor 5-HT_{1A} en la transferencia de la actividad ictal.

Por otro lado, la activación del receptor 5-HT_{1A} tiene efectos adicionales como la secreción de factores neurotróficos como el BDNF, la liberación de noradrenalina y acetilcolina o el aumento de receptores de glucocorticoides (Barnes y Sharp, 1999; Zhou et al., 2013). La activación de este tipo de

receptor de serotonina a nivel postsináptico provoca la liberación de noradrenalina, actuando a través del *locus coeruleus*, y un aumento de la actividad colinérgica (Barnes y Sharp, 1999). En diferentes estudios se ha observado un aumento de BDNF en el modelo de kindling eléctrico en hipocampo (Reibel et al., 2003; Ullal et al., 2007) y, también, en el modelo de over-kindling (Chihara et al., 2011). Tirassa y Costa (2007) demostraron que durante el kindling químico con PTZ había un aumento de BDNF en septum e hipocampo.

En el modelo agudo de PTZ, el efecto de la activación del receptor 5-HT_{1A} sobre los factores neurotróficos y otros neurotransmisores no se aprecia debido al breve curso temporal del modelo. En los modelos crónicos de kindling, el BDNF y otros factores neurotróficos podrían actuar directamente en la actividad ictal, a través del receptor 5-HT_{1A}, induciendo un aumento de la liberación de glutamato e inhibiendo la de serotonina que facilitarían el inicio y la propagación de la actividad epileptiforme a lo largo del experimento (Xu et al., 2004; Benmansour et al., 2008; Chihara et al., 2011). Esta depleción de serotonina se reflejaría en nuestros estudios PET con ¹⁸F-MPPF con un aumento del *binding potential* en hipocampo y septum (Zimmer et al., 2003; Tirassa y Costa, 2007), como así se ha observado en los modelos de kindling.

Todos estos cambios provocados por la activación del receptor 5-HT_{1A} y la posterior liberación de BDNF y otros factores neurotróficos concuerdan con la teoría del mecanismo prion-like como promotor de la epileptogénesis, ya que como producto de las crisis epilépticas se facilitaría la aparición de otra crisis posterior y la autoperpetuación de la epilepsia (Bertram, 2007; Ransom y Blumenfeld, 2007; Frost y Diamond, 2010; Orzi et al., 2013).

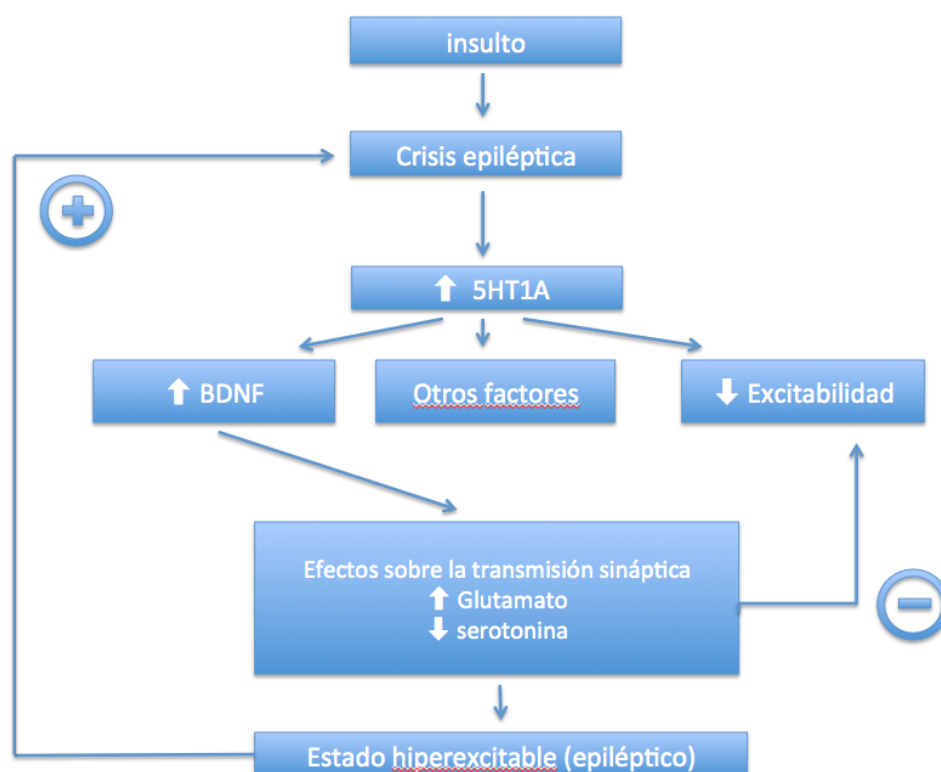


Figura 69. Diagrama de los efectos de la activación del receptor 5HT_{1A} tras las crisis epilépticas.

En el modelo de kindling químico, tanto el grupo positivo como el negativo presentaron aumento en el *binding potential* del MPPF, mientras que sólo presentaron hipometabolismo los animales que sufrieron crisis convulsivas. Estos datos señalarían a que el sistema serotoninérgico estaría implicado en la epileptogénesis pero no en la transferencia de la actividad ictal a otras estructuras necesaria para la generalización de las crisis convulsivas.

Los estudios en pacientes de TLE con PET muestran un hipometabolismo en el foco en los estudios con FDG (Hong et al., 2002; Choi et al., 2003; Willmann et al., 2007; Duncan, 2009). Sin embargo, en algunos de estos pacientes, este hipometabolismo aparece también en el hemisferio contralateral, lo que se denomina foco espejo (Engel et al., 1982; Jokeit et al., 1997; Willmann et al., 2007). Los estudios realizados con radiotrazadores del receptor 5-HT_{1A} muestran una mayor asimetría y mejor definición del foco epiléptico que los

estudios con el análogo de la glucosa (Savic et al., 2004; Ito et al., 2007; Liew et al., 2009; Didelot et al., 2010).

Teniendo en cuenta nuestros resultados y los observados por otros grupos en diferentes modelos animales, junto con los datos obtenidos en estudios con pacientes, el radiotrazador 18F-FDG sería un biomarcador por imagen de la generalización de las crisis y no de la epileptogénesis en sí. Sin embargo, los trazadores del receptor de serotonina 5-HT_{1A}, como el 18F-MPPF, serían biomarcadores específicos del proceso de epileptogénesis.

Considerando nuestros resultados en conjunto, el sistema serotoninérgico se activaría en respuesta al insulto epileptógeno, a través del receptor 5-HT_{1A}, con un efecto inicial de inhibición de los circuitos neurales con el objetivo de controlar la actividad epileptiforme, mientras que si el estímulo epileptogénico se mantiene en el tiempo, este mecanismo de autocontrol desaparecería y se favorecería el establecimiento de la epileptogénesis y el desarrollo de crisis convulsivas (Cagnotto et al., 1998).

6. Conclusiones

- En los estudios dinámicos de captación de ¹⁸F-FDG en el modelo agudo de PTZ se observó una mayor entrada de glucosa durante la fase ictal y un hipometabolismo generalizado durante la depresión postictal.
- En los 3 modelos de epileptogénesis se ha observado un hipometabolismo. En el caso del modelo agudo, esta menor captación es generalizada. En los modelos crónicos de kindling es un hipometabolismo localizado en la corteza cerebral que sugiere cambios permanentes debidos a la epileptogénesis.
- En el modelo de kindling químico con PTZ se observó un hipermetabolismo en la protuberancia de los animales que reflejaría la activación de estructuras como el locus coeruleus como consecuencia de las crisis epilépticas provocadas.
- Durante la epileptogénesis se produce un aumento de la densidad del receptor 5-HT_{1A} en la fase aguda como respuesta a las crisis convulsivas. Sin embargo, en la fase crónica se produce una depleción de serotonina que, junto con otras alteraciones, aumenta la excitabilidad neuronal.
- El tratamiento con el agonista de 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, tiene efecto anticonvulsivo en el modelo agudo de crisis epilépticas en el que se observa un aumento de este receptor en hipocampo. Sin embargo, este efecto desaparece en la fase crónica de la epileptogénesis.
- Los receptores glutamatérgicos y gabaérgicos se alteran de forma diferente según el protocolo utilizado para inducir la epileptogénesis.
- Los modelos de epileptogénesis utilizados en este trabajo no producen neurodegeneración ni respuesta inflamatoria a excepción del kindling eléctrico, donde únicamente se vio gliosis reactiva en el ventrículo cerebral.

Las conclusiones anteriores sugieren la participación del sistema serotoninérgico a través del receptor 5-HT_{1A} en respuesta al insulto, en el inicio de la epileptogénesis mediando circuitos de autocontrol o inhibición de la actividad epileptiforme, siendo en esta fase sensible al tratamiento con agonistas de este receptor. Sin embargo, tras el periodo inicial, el mantenimiento del insulto bloquearía este efecto inhibitorio y generaría mecanismos que favorecen la epileptogénesis.

7. Bibliografía

A

Acampora D., Mazan S., Avantaggiato V., Barone P., Tuorto F., Lallemand Y., Brulet P., Simeone A., 1996. *Epilepsy and brain abnormalities in mice lacking Otx1 gene.* Nature Genetics, 14, 218-222

Akhlaghi Z., Sayyah M., Mokhtari M., Ahmadi A., 2012. *Effect of intra-amygdala injection of lipopolysaccharide on kindling epileptogenesis in adult rats.* Archives of Iranian Medicine, 15

Akiyama K., Yoneda Y., Ogita K., Itoh T., Daigen A., Sora I., Kohira I., Ujike H., Otsuki S., 1992. *Ionotropic excitatory amino acid receptors in discrete brain regions of kindled rats.* Brain Research, 587, 73-82

Alexander G.M., Godwin D.W., 2006. *Metabotropic glutamate receptors as a strategic target for the treatment of epilepsy.* Epilepsy Research, 71, 1-22

Andrade R., 1998. *Regulation of membrane excitability in the central nervous system by serotonin receptor subtypes.* Annals New York Academy of Sciences, 15, 190-203

Aniol V.A., Stepanichev M.Y., Lazareva N.A., Gulyaeva N.V., 2011. *An early decrease in cell proliferation after pentylenetetrazole-induced seizures.* Epilepsy Behavior, 22, 433-441

Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P., Haydon P.G., 1999. *Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner.* Trends in Neuroscience, 22, 215-220

Assem-Hilger E., Lanzenberger R., Savli M., Wadsak W., Mitterhauser M., Mien L.K., Stögmanner E., Baumgartner C., Kletter K., Asenbaum S., 2010. *Central serotonin 1A receptor binding in temporal lobe epilepsy: a [carbonyl-¹¹C]WAY-100635 PET study.* Epilepsy & Behavior, 19, 467-473

Aune T.M., McGrath K.M., Sarr T., Bombara M.P., Kelley K.A., 1993. *Expression of 5HT_{1a} receptor on activated human T cells.* The Journal of Immunology, 151, 1175-1183

Aznavour N., Zimmer L., 2007. *[¹⁸F]MPPF as a tool for the in vivo imaging of 5-HT_{1A} receptors in animal and human brain.* Neuropharmacology, 52, 695-707

B

Bagdy, G., Kecskemeti, V., Riba, P., Jakus, R., 2007. *Serotonin and epilepsy.* Journal of Neurochemistry, 100, 857-873

Balcerzyk M., Kontaxakis G., Delgado M., García-García L., Correcher C., González AJ., González A., Rubio J.L., Benlloch J.M., Pozo M.A., 2009. *Initial performance evaluation of a high resolution Albira small animal positron emission tomography scanner with monolithic crystals and depth-of-interaction encoding from user's perspective.* Measurement Science and Technology, 20, 104011

Barnes N.M., Sharp T., 1999. *A review of central 5-HT receptors and their function.* Neuropharmacology, 38, 1083-1152

Battaglia G., Bassanini S., 2006. *Chapter 32- MAM and other "lesion" models of developmental epilepsy In Models of Seizures and Epilepsy.* Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) Elsevier, Amsterdam

Ben-Ari Y., Kmjevic K., Reiffenstein R.J., Reinhardt W., 1981. *Inhibitory conductance changes and action of gamma-aminobutyrate in rat hippocampus.* Neuroscience, 6, 2445-2463

Bender R.A., Dubé C., Gonzalez-Vega R., Mina E.W., Baram T.Z., 2003. *Mossy fiber plasticity and enhanced hippocampal excitability, without hippocampal cell loss or altered neurogenesis, in an animal model of prolonged febrile seizures.* Hippocampus, 13, 399-412

Benmansour S., Deltheil T., Piotrowski J., Nicolas L., Reperant C., Gardier A.M., Frazer A., David D.J., 2008. *Influence of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on serotonin neurotransmission in the hippocampus of adult rodents.* European Journal of Pharmacology, 587, 90-98

Bertram E., 2007. *The relevance of kindling for human epilepsy.* Epilepsia, 48 (Suppl.2), 65-74

Binder D.K., Routbort M.J., Ryan T.E., Yancopoulos G.D., McNamara J.O., 1999. *Selective inhibition of kindling development by intraventricular administration of TrkB receptor body.* Journal of Neuroscience, 19, 1424-1436

Binder D.K., Croll S.D., Gall C.M., Scharfman H.E., 2001. *BDNF and epilepsy: too much of a good thing?* Trends in Neuroscience, 24, 47-53

Binder D.K., Yao X, Verkman A.S., Manley G.T., 2006. *Increased seizure duration in mice lacking aquaporin-4 water channels.* Acta Neurochirurgica Supplementum, 96, 389-392

Bonnycastle D.D., Giarman N.J., Paasonen M.K., 1957. *Anticonvulsant compounds and 5-hydroxytryptamine in rat brain.* British Journal of Pharmacology, 12, 228-231

Brevard M.E., Kulkarni P., King J.A., Ferris C.F., 2006. *Imaging the neural substrates involved in the genesis of pentylenetetrazol-induced seizures.* Epilepsia. 47, 745-54

Bucket W.R., 1979. *Intravenous bicuculline in mice facilitates in vivo evaluation of drugs affecting GABA like mechanisms.* British Journal of Pharmacology, 68, 177P-178P

C

Cagnotto A., Crespi D., Mancini L., Manzoni C., Presti M.L., Gariboldi M., Vezzani A., Mennini T., 1998. *Lasting increase in serotonin 5-HT_{1A} but not 5-HT₄ receptor subtypes in the kindled rat dentate gyrus: dissociation from local presynaptic effects.* Journal of Neurochemistry, 70, 850-857

Carmody S., Brennan L., 2010. *Effects of pntylenetetrazole-induced seizures on metabolomic profiles of rat brain.* Neurochemistry international, 56, 340-344

Carne R.P., O'Brien T.J., Kilpatrick C.J., MacGregor L.R., Hicks R.J., Murphy M.A., Bowden S.C., Kaye A.H., Cook M.J., 2004. *MRI-negative PET-positive temporal lobe epilepsy: a distint surgically remediable syndrome.* Brain, 127, 2276-2285

Castell, F., Cook, G.J., 2008. *Quantitative techniques in 18FDG PET scanning in oncology.* Br J Cancer. 98, 1597-601

Cavalheiro E.A., Naffah-Mazzacoratti M.G., Mello L.E., Leite J.P., 2006. *Chapter 35- The pilocarpine model of seizures In Models of Seizures and Epilepsy.* Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) Elsevier, Amsterdam

Cavazos J.E., Das J., Sutula T.P., 1994. *Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures.* Journal of Neuroscience, 14, 3106-3121

Chae T., Kwon Y.T., Bronson R., Dikkes P., Li E., Tsai L.H., 1997. *Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality.* Neuron, 18, 29-42

Chihara Y., Ueda Y., Doi T., Willmore L.J., 2011. *Role of endoplasmic reticulum stress in the amygdaloid kindling model of rats.* Neurochemistry Research, 36, 1834-1839

Chinvarun Y., 2013. *Application of PET and SPECT in epilepsy.* Neurology Asia, 18, 23-25

Choi J.Y., Kim S.J., Hong S.B., Seo D.W., Hong S.C., Kim B.T., Kim S.E., 2003. *Extratemporal hypometabolism on FDG PET in temporal lobe epilepsy as a predictor of seizure outcome after temporal lobectomy.* European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 30, 581-587

Choi J., Koh S., 2008. *Role of brain inflammation in epileptogenesis.* Yonsei Medical Journal, 49, 1-18

Clinckers R., Smolders I., Meurs A., Ebinger G., Michotte Y., 2004. *Anticonvulsant action of hippocampal dopamine and serotonin is independently mediated by D2 and 5-HT_{1A} receptors.* Journal of Neurochemistry, 89, 834-843

Corda M.G., Orlandi M., Lecca D., Carboni G., Frau V., Giorgi O., 1991. *Pentylenetetrazol-induced kindling in rats: effect of GABA function inhibitors.* Pharmacology Biochemistry and Behavior, 40, 329-333

Corda M.G., Orlandi M., Lecca D., Giorgi O., 1992. *Decrease in GABAergic function induced by pentylenetetrazol kindling in rats: antagonism by MK-801.* The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 262, 792-800

Coulter D.A., Eid T., 2012. *Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy.* Glia, 60, 1215-1226

Cremer C.M., Palomero-Gallagher N., Bidmon H.J., Schleicher A., Speckmann E.J., Zilles K., 2009. *Pentylenetetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain.* Neuroscience, 163, 490-499

D

Dedeurwaerdere S., Jupp B., O'Brien T., 2007. *Positron emission tomography in basic epilepsy research: a view of the epileptic brain.* Epilepsia; 48; 56-64

De Llano, I., 2005. *Epilepsia farmacorresistente del lóbulo temporal. Aportaciones de la neurofisiología clínica.* Tesis doctoral Universidad Complutense

Depaulis A., van Luijckelaar G., 2006. *Chapter 18 – Genetic models of absence epilepsy in the rat In Models of Seizures and Epilepsy.* Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) Elsevier, Amsterdam

Devinsky O., Vezzani A., Najjar S., De Lanerolle N.C., Rogawski M.A., 2013. *Glia and epilepsy: excitability and inflammation.* Trends in Neuroscience, 36, 174-184

Dhir A., 2012. *Pentylenetetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy.* Current Protocols in Neuroscience, 9, 9.37

Didelot A., Ryvlin P., Lothe A., Merlet I., Hammers A., Mauguière F., 2008. *PET imaging of brain 5-HT_{1A} receptors in the preoperative evaluation of temporal lobe epilepsy.* Brain, 131, 2751-2764

Didelot A., Mauguière F., Redouté J., Bouvard S., Lothe A., Reilhac A., Hammers A., Costes N., Ryvlin P., 2010. *Voxel-based analysis of asymmetry index maps increases the specificity of 18F-MPPF PET abnormalities for localizing the epileptogenic zone in temporal lobe epilepsies.* Journal of Nuclear Medicine, 51, 1732-1739

Diehl R.G., Smialoski A., Gotwo T., 1984. *Development and persistence of kindled seizures after repeated injections of pentylenetetrazol in rats and guinea pigs.* Epilepsia, 25; 506-510

Diehl B., LaPresto E., Najm I., Raja S., Rona S., Babb T., Ying Z., Bingaman W., Lüders H.O., Ruggieri P., 2003. *Neocortical temporal FDG-PET hypometabolism correlates with temporal lobe atrophy in hippocampal sclerosis associated with microscopic cortical dysplasia.* Epilepsia, 44, 559-564

Dubé C.M., Baram T.Z., 2006. Chapter 26 – Complex Febrile Seizures – An experimental model. In: Models of Seizures and Epilepsy, Asla Pitkänen, P.A. Schwartzkroin, S.L. Moshé; eds Elsevier, Amsterdam

Dudek F.E., Clark S., Williams P.A., Grabenstatter H.L., 2006. Chapter 34- *Kainate-induced status epilepticus: a chronic model of acquired epilepsy In Models of Seizures and Epilepsy.* Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) Elsevier, Amsterdam

Duncan, J., 2009. *The current status of neuroimaging for epilepsy.* Current Opinion in Neurology, 22, 179-184

During M.J., Spencer D.D., 1993. *Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain.* Lancet, 341, 1607-1610

E

Ekonomou A., Smith A.L., Angelatou F., 2001. *Changes in AMPA receptor binding and subunit messenger RNA expression in hippocampus and cortex in the pentylenetetrazole-induced 'kindling' model of epilepsy.* Molecular Brain Research, 95, 27-35

El Hamdi G., Boutroy M.J., Nehlig A., 1992. *Effects of pentylenetetrazol-induced seizures on dopamine and norepinephrine levels and on glucose utilization in various brain regions of the developing rat.* International Journal of Developmental Neuroscience, 10, 301-311

Engel J.Jr., Kuhl D.E., Phelps M.E., Crandall P.H., 1982. *Comparative localization of epileptic foci in partial epilepsy by PCT and EEG.* Annals of Neurology, 12, 529-537

Engel J.Jr., Wolfson L., Brown L., 1978. *Anatomical correlates of electrical and behavioral events relate to amygdaloid kindling.* Annals of Neurology, 3, 538-544

Engel J.Jr., 2001. *Intractable epilepsy: definition and neurobiology.* Epilepsia, 42 (Suppl.6), 3

Erakovic V., Zupan G., Varljen J., Laginja J., Simonic A., 2000. *Lithium plus pilocarpine induced status epilepticus – biochemical changes.* Neuroscience Research, 36, 157-166

Erdogan F., Gölgeli A., Arman F., Ersoy A.O., 2004. *The effects of pentylenetetrazol-induced status epilepticus on behavior, emotional memory, and learning in rats.* Epilepsy & behavior, 5, 388-393

F

Fabene P.F., Bramanti P., Constantin G., 2010. *The emerging role for chemokines in epilepsy.* Journal of Neuroimmunology, 224, 22-27

Felippotti T.T., Ferreira C.M.dR., de Freitas RL., de Oliveira R.C., de Oliveira R., Paschaolin-Maurin T., Coimbra N.C., 2011. *Paradoxical effect of noradrenaline-mediated neurotransmission in the antinociceptive phenomenon that accompanies tonic-clonic seizures: Role of locus coeruleus neurons and α 2- and β -noradrenergic receptors.* Epilepsy & Behavior, 22, 165-177

Fischer W., Kittner H., 1998. *Influence of etanol on the pentylenetetrazol-induced kindling in rats.* Journal of Neural Transmission, 105, 1129-1142

Fornai F., Ruffoli R., Giorgi F.S., Paparelli A., 2011. *The role of locus coeruleus in the antiepileptic activity induced by vagus nerve stimulation.* European Journal of Neuroscience, 33, 1269-1278

Freire-Garabal M., Núñez M.J., Balboa J., López-Delgado P., Gallego R., García-Caballero T., Fernández-Roel M.D., Brenlla J., Rey-Méndez M., 2003. *Serotonin upregulates the activity of phagocytosis through 5-HT_{1A} receptors.* British Journal of Pharmacology, 139, 457-463

Frost B., Diamond M.I., 2010. *Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases.* Nature Reviews Neuroscience, 11, 155-159

Fumita M., Inni R.B., 2002. *In vivo molecular imaging: ligand development and research applications. In: Neuropsychopharmacology – the fifth generation of*

progress. Davis KL., Charney D., Coyle JT., Nemeroff C., ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, EEUU.

G

Garzillo C.L., Mello L.E.A.M., 2002. *Characterization of reactive astrocytes in the chronic phase of the pilocarpine model of epilepsy.* *Epilepsia*, 43 (Suppl.5), 107-109

Gilbert M.E., Goodman J.H., 2006. *Chapter 31- Chemical kindling In Models of Seizures and Epilepsy.* Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) Elsevier, Amsterdam

Goddard G.V., McIntyre D.C., Leech C.K., 1969. *A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation.* *Exp Neurol*, 25, 295-330

Goffin K., Nissinen J., Van Laere K., Pitkänen A., 2007. *Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat.* *Experimental Neurology*, 205, 501-505

Goffin K., Dedeurwaerdere S., Van Laere K., Van Paesschen W., 2008. *Neuronuclear assessment of patients with epilepsy.* *Semin Nucl Med*, 38, 227-239

Goffin, K., Van Paesschen, W., Dupont, P., Van Laere, K., 2009. Longitudinal microPET imaging of brain glucose metabolism in rat lithium-pilocarpine model of epilepsy. *Exp Neurol*. 217, 205-9

Goodwin G.M., Souza R.J., Green A.R., Heal D.J., 1987. *The pharmacology of the behavioural and hypothermic responses of rats to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT).* *Psychopharmacology*, 91, 506-511

Guo Y., Gao F., Wang S., Ding Y., Zhang H., Wang J., Ding M.P., 2009. *In vivo mapping of temporospatial changes in glucose utilization in rat brain during epileptogenesis: an 18F-fluorodeoxyglucose-small animal positron emission tomography study.* *Neuroscience*. 162, 972-9

H

Hecimovic H., Goldstein J.D., Sheline Y.I., Gilliam F.G., 2003. *Mechanisms of depression in epilepsy from a clinical perspective.* *Epilepsy and Behavior*, 4, S25-S30

Herman, S.T., 2006 *Clinical trials for prevention of epileptogenesis.* *Epilepsy Research*, 68, 19-94

Hong S.B., Han H.J., Roh S.Y., Seo D.W., Kim S.E., Kim K.H., 2002. *Hypometabolism and interictal spikes during positron emission tomography scanning in temporal lobe epilepsy.* European Neurology, 48, 65-70

Hu Y., Jiang L., Chen H., Zhang X., 2012. *Expression of AMPA receptor subunits in hippocampus after status convulsion.* Child's Nervous System, 28, 911-918

I

Iken K., Chheng S., Fargin A., Goulet A.C., Kouassi E., 1995. *Serotonin upregulates mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation through 5-HT_{1a} receptors.* Cellular immunology, 163, 1-9

Hutchins, G.D., Miller, M.A., Soon, V.C., Receveur, T., 2008. *Small animal PET imaging.* ILAR Journal, 49, 54-65

Ito S., Suhara T., Ito H., Yasuno F., Ichimiya T., Takano A., Maehara T., Matsuura M., Okubo Y., 2007. *Changes in central 5-HT_{1A} receptor binding in mesial temporal epilepsy measured by positron emission tomography with [11C]WAY100635.* Epilepsy Research, 73, 111-118

J

Jobe P.C., Browning R.A., 2006. *Chapter 20 - Mammalian models of genetic epilepsy characterized by sensory-evoked seizures and generalized seizure susceptibility In Models of Seizures and Epilepsy.* Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) Elsevier, Amsterdam

Jokeit H., Seitz R.J., Markowitsch H.J., Neumann N., Witte O.W., Ebner A., 1997. *Prefrontal asymmetric interictal glucose hypometabolism and cognitive impairment in patients with temporal lobe epilepsy.* Brain, 120, 2283-2294

Jupp, B., Williams, J., Binns, D., Hicks, R.J., O'Brien, T.J., 2007. *Imaging small animal models of epileptogenesis.* Neurology Asia; 12; 51-54

Jupp, B., Williams, J., Binns, D., Hicks, R.J., Cardamone L., Jones N., Rees S., O'Brien, T.J., 2012. *Hypometabolism precedes limbic atrophy and spontaneous seizures in a rat model of TLE.* Epilepsia, 53, 1233-1244

Juul-Jensen, P., Foldspang, A., 1983. *Natural history of epileptic seizures.* Epilepsia. 24, 297-312

K

Kapur J., Bennett J.P. Jr., Wooten G.F., Lothman E.W., 1989. *Evidence for a chronic loss of inhibition in the hippocampus after kindling: biochemical studies.* *Epilepsy Research*, 4, 100-108

Kelly K.M., 2006. Chapter 40 – Stroke. In: *Models of Seizures and Epilepsy* Vol., Asla Pitkänen., P.A. Schwartzkroin, S.L. Moshé, eds. Elsevier, Amsterdam

Keogh, B.P., Cordes, D., Stanberry, L., Figler, B.D., Robbins, C.A., Tempel, B.L., Green, C.G., Emmi, A., Maravilla, K.M., Schwartzkroin, P.A., 2005. BOLD-fMRI of PTZ-induced seizures in rats. *Epilepsy Res.* 66, 75-90

Khan A., Batool F., Haleem D.J., 2001. *Behavioral effects of 8-OH-DPAT in single and repeated haloperidol injected rats.* *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14, 9-17

Khurgel M., Ivy G.O., 1996. *Astrocytes in kindling: relevance to epileptogenesis.* *Epilepsy Research*, 26, 163-175

Koepp M.J., Hammers A., Labbé C., Woemann F.G., Brooks D.J., Duncan J.S., 2000. *¹¹C-flumazenil PET in patients with refractory temporal lobe epilepsy and normal MRI.* *Neurology*, 54, 332-339

Kupferberg H., 2001. *Animal models used in the screening of antiepileptic drugs.* *Epilepsia*, 42 (Suppl. 4), 7-12

L

Lamberty Y., Klitgaard H., 2000. *Consequences of pentylenetetrazol kindling on spatial memory and emotional responding in the rat.* *Epilepsy & Behaviour*, 1, 256-261

Lamusuo S., Jutila L., Ylinen A., Kälviäinen R., Mervaala E., Haaparanta M., Jääskeläinen S., Partanen K., Vapalathi M., Rinne J., 2001. *[¹⁸F]FDG-PET reveals temporal hypometabolism in patients with temporal lobe epilepsy even when quantitative MRI and histopathological analysis show only mild hippocampal damage.* *Archives of Neurology*, 58, 933-939

Lancelot, S., Zimmer L., 2010. *Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology.* *Trends in Pharmacological Sciences*, 31, 411-417

Lanfumey L., Hamon M., 2000. *Central 5-HT_{1A} receptors: regional distribution and functional characteristics.* *Nuclear Medicine and Biology*, 27, 429-435

Levin, C.S., 2005. *Primer on molecular imaging technology.* *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 32 (Suppl. 2), S325-45

Lian X.Y., Stringer J.L., 2004. *Inhibition of aconitase in astrocytes increases the sensitivity to chemical convulsants.* *Epilepsy Research*, 60, 41-52

Liefwaard L.C., Ploeger B.A., Molthoff C.F.M., de Jong H.W.A.M., Dijkstra J., van der Weerd L., Lammertsma A.A., Danhof M., Voskuyl R.A., 2009. *Changes in GABAA receptor properties in amigdala kindled animals: in vivo studies using [11C]flumazenil and positron emission tomography.* *Epilepsia*, 50, 88-98

Liew C.J., Lim Y.M., Bonwetsch R., Shamim S., Sato S., Reeves-Tyer P., Herscovitch P., Dustin I., Bagic A., Giovacchini G., Theodore W., 2009. *18F-FCWAY and 18F-FDG PET in MRI negative temporal lobe epilepsy.* *Epilepsia*, 50, 234-239

Lin W.H., Huang H.P., Lin M.X., Chen S.G., Lv X.C., Che C.H., Lin J.L., 2007. *Seizure-induced 5-HT release and chronic impairment of serotonergic function in rats.* *Neuroscience Letters*, 534, 1-6

López-Meraz M.L., González-Trujano M.E., Neri-Bazán L., Hong E., Rocha L.L., 2005. *5-HT_{1A} receptor agonists modify epileptic in three experimental models in rats.* *Neuropharmacology*, 49, 367-375

Löscher W., 2002. *Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy.* *Epilepsy Research*, 50, 105-123

Luhmann H.J., 2006. *Chapter 22- The cortical freeze lesion model In Models of Seizures and Epilepsy.* Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) Elsevier, Amsterdam

M

Marinho M.M., de Sousa F.C., de Bruin V.M., Vale M.R., Viana G.S., 1998. *Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum.* *Neurochemistry International*, 33, 299-306

Martín E.D., Pozo M.A., 2006. *Animal models for the development of new neuropharmacological therapeutics in the status epilepticus.* *Current Neuropharmacology*, 4, 33-40

Mathern G.W., Babb T.L., Leite J.P., Pretorius J.K., Yeoman K.M., Kuhlman P.A., 1996. *The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy.* *Epilepsy Research*, 26, 151-161

McIntyre D.C., 2006. *Models of seizures and epilepsy. Chapter 28: The kindling phenomenon. In Models of Seizures and Epilepsy.* Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) Elsevier, Amsterdam

McNamara J.O., 1984. *Kindling: an animal model of complex partial epilepsy.* Annals of Neurology, 16, S72-76

Merlet, I., Ostrowsky, K., Costes, N., Ryvlin, P., Isnard, J., Faillenot, I., Lavenne, F., Dufournel, D., Le Bars, D., Mauguiere F., 2004. *5-HT_{1A} receptor binding and intracerebral activity in temporal lobe epilepsy: an [18F]MPPF-PET study.* Brain, 127, 900-913

Michelucci R., Pasini E., Riguzzi P., Volpi L., Dazzo E., Nobile C., 2012. *Genetics of epilepsy and relevance to current practice.* Current Neurology and Neuroscience Reports, 12, 445-455

Minamoto Y., Itano T., Tokuda M., Matsui H., Janjua N.A., Hosokawa K., Okada Y., Murakami T.H., Negi T., Hatase O., 1992. *In vivo microdialysis of amino acid neurotransmitters in the hippocampus in amygdaloid kindled rat.* Brain Research, 573, 345-348

Miyazaki T., Miyamoto O., Janjua N.A., Hata T., Takahashi F., Itano T., 2003. *Reactive gliosis in areas around third ventricle in association with epileptogenesis in amygdaloid-kindled rat.* Epilepsy Research, 56, 5-15

Mody I., Heinemann U., 1987. *NMDA receptors of dentate gyrus granule cells participate in synaptic transmission following kindling.* Nature, 326, 701-704

Morimoto, K., Fahnestock, M., Racine, R.J., 2004. *Kindling and status epilepticus models of epilepsy.* Progress in Neurobiology, 73, 1-60

Müller C.J., Bankstahl M., Gröticke I., Löscher W., 2009. *Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage.* European Journal of Pharmacology, 619, 15-24

O

O'Brien T.J., Miles K., Ware R., Cook M.J., Binns D.S., Hicks R.J., 2008. *The cost-effective use of 18F-FDG PET in the presurgical evaluation of medically refractory focal epilepsy.* Journal of Nuclear Medicine, 49, 931-937

O'Dell C.M., Das A., Wallace G., Ray S.K., Banik N.L., 2012. *Underlying seizures in medial temporal lobe epilepsy and posible therapeutic targets: a review.* Journal of Neuroscience Research, 90, 913-924

Oishi R., Suenaga N., 1982. *The role of the locus coeruleus in regulation of seizure susceptibility in rats.* Japanese Journal of Pharmacology, 32, 1075-1081

Ono, J., Vieth, R., Walson, P., 1990. *Electrocorticographical observation of seizure induced by pentylentetrazol (PTZ) injection in rat.* Functional Neurology. 5, 345-352

Orzi F., Casolla B., Rocchi R., Fornai F., 2013. *Prion-like mechanisms in epileptogénesis.* Neurological Sciences, 34, 1035-1038

P

Padma M.V., Simkins R., White P., Satter M., Christian B.T., Dunigan K., Lee C., Jacobs M., Mukherjee J., Shi B., Mantil J.C., 2004. *Clinical utility of 11C-flumazenil positron emission tomography in intractable temporal lobe epilepsy.* Neurology India, 52, 457-462

Padou V., Boyet S., Nehlig A., 1995. *Changes in transport of [14C] alpha-aminoisobutyric acid across the blood-brain barrier during pentylenetetrazol-induced status epilepticus in the immature rat.* Epilepsy Research, 22, 175-183

Parent J.M., Elliott R.C., Pleasure S.J., Barbaro N.M., Lowenstein D.H., 2006. *Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy.* Annals Neurology, 59, 81-91

Park J.H., Cho H., Kim H., Kim K., 2006. *Repeated brief epileptic seizures by pentylenetetrazole cause neurodegeneration and promote neurogenesis in discrete brain regions of freely moving rats.* Neuroscience, 140, 673-684

Paxinos G., Watson C., 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates.*

Pitkänen A., Schwartzkroin P.A., Moshé S.L., 2006. *Models of seizures and epilepsy.* Elsevier Academic Press.

R

Racine R.J., 1972a. *Modification of seizure activity by electrical stimulation: I. afterdischarge threshold.* Electroencephalography and clinical neurophysiology, 32, 269-279

Racine R.J., 1972b. *Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure.* Electroencephalography and clinical neurophysiology, 32, 281-294

Racine R.J., Burnham W.M., Gartner, J.G., Levitan D., 1973. *Rates of motor seizure development in rats subjected to electrical brain stimulation: strain and inter-stimulation interval effects.* Electroencephalography and Clinical Neurophysiology, 35, 553-556

Rajasekaran K., Todorovic M., Kapur J., 2012. *Calcium-permeable AMPA receptors are expressed in a rodent model of status epilepticus.* Annals of Neurology, 72, 91-102

Ramani R., 2008. *Vagus nerve stimulation therapy for seizures.* Journal of Neurosurgical Anesthesiology, 20, 29-35

Ramos R.L., Loturco J.J., 2006. Chapter 19 – *Models with spontaneous seizures and developmental disruption of genetic etiology* In *Models of Seizures and Epilepsy*. Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) Elsevier, Amsterdam

Ransom, C.B., Blumenfeld H., 2007. Chapter 23- *Acquired epilepsy: cellular and molecular mechanisms in Molecular Neurology*. Stephen G. Waxman, Elsevier, Amsterdam

Reibel S., Benmaamar R., Le B.T., Larmet Y., Kalra S.P., Marescaux C., Depaulis A., 2003. *Neuropeptide Y delays hippocampal kindling in the rat.* Hippocampus, 13, 557-560

S

Salgado D., Alkadhi K.A., 1995. *Inhibition of epileptiform activity by serotonin in rat CA1 neurons.* Brain research, 669, 176-182

Sanchez R.M., Jensen F.E., 2006. Chapter 25 – *Modeling hypoxia-induced seizures and hypoxic encephalopathy in the neonatal period.* In: *Models of Seizures and Epilepsy Vol.*, Asla Pitkänen., P.A. Schwartzkroin, S.L. Moshé, eds. Elsevier, Amsterdam

Sarkisian M.R., Frenkel M., Li W., Oborski J.A., LoTurco J.J., 2001. *Altered interneuron development in the cerebral cortex of the flathead mutant.* Cerebral Cortex, 11, 734-743

Savic I., Lindström P., Gulyás B., Halldin C., Andréa B., Farde L., 2004. *Limbic reductions of 5-HT_{1A} receptor binding in human temporal lobe epilepsy.* Neurology, 62, 1343-1351

Sawamura A., Hashizume K., Yoshida K., Tanaka T., 2001. *Kainic acid-induced substantia nigra seizure in rats: behaviour, EEG and metabolism.* Brain Res, 911, 89-95

Scharfman H.E., 2007 *The neurobiology of epilepsy.* Current Neurology and Neuroscience Reports, 7, 348-354

Selberg, O., Muller, M.J., van den Hoff, J., Burchert, W., 2002. Use of positron emission tomography for the assessment of skeletal muscle glucose metabolism. Nutrition. 18, 323-8

Shin C., Pedersen H.B., McNamara J.O., 1985. *Y-aminobutyric acid and benzodiazepine receptors in the kindling model of epilepsy: a quantitative radiohistochemical study.* Journal of Neuroscience, 5, 2696-2701

Silveira D.C., de LaCalle S., Lu J., Klein P., Holmes G.L., Herzog A.G., 1998. *Activation of the locus coeruleus after amygdaloid kindling.* Epilepsia, 39, 1261-1264

Sloviter R.S., 2008. *Hippocampal epileptogenesis in animal models of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: the importance of the “latent period” and other concepts.* Epilepsia, 29 (Suppl.9), 85-92

Stables J.P., Bertram E.H., White H.S., Coulter D.A., Dichter M.A., Jacobs M.P., Loscher W., Lowenstein D.H., Moshe S.L., Noebels J.L., Davis M., 2002. *Models for epilepsy and epileptogenesis: report from the NIH workshop, Bethesda, Maryland.* Epilepsia, 43, 1410-1420

Stafstrom C.E., 2002. *The incidence and prevalence of febrile seizures.* In: Febrile Seizures, Part I. Ed. Academic Press, San Diego

Stein P., Savli M., Wadsak W., Mitterhauser M., Fink M., Spindelegger C., Mien L., Moser U., Dudczak R., Kletter K., Kasper S., Lazenberger R., 2008. *The serotonin-1A receptor distribution in healthy men and women measured by PET and [carbonyl-11C]WAY-100635.* European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 35, 2159-2168

Sutula T.P., Ockuly J., 2006. *Chapter 32 – Kindling, spontaneous seizures, and consequences of epilepsy: more than a model.* In *Models of Seizures and Epilepsy.* Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) Elsevier, Amsterdam

T

Tai Y.C., Laforest R., 2005. *Instrumentation aspects of animal PET.* Annual Review of Biomedical Engineering, 7, 255-285

Theodore W.H., Fisher R.S., 2004. *Brain stimulation for epilepsy.* Lancet Neurology, 3, 111-8

Theodore W.H., Kelley K., Toczek M.T., Gaillard W.D., 2004. *Epilepsy duration, febrile seizures and cerebral glucose metabolism.* Epilepsia, 45, 276-279

Theodore W.H., Wiggs E.A., Martinez A.R., Dustin I.H., Khan O.I., Appel S., Reeves-Tyer P., Sato S., 2012. *Serotonin 1A receptors, depression and memory in temporal lobe epilepsy.* Epilepsia, 53, 129-133

Tirassa P., Costa N., 2007. *CCK-8 induces NGF and BDNF synthesis and modulates TrkA and TrkB expression in the rat hippocampus and septum: effects on kindling development.* Neurochemistry International, 50, 130-138

Titulaer M.N., Kamphuis W., Pool C.W., van Heerikhuize J.J., Lopes da Silva F.H., 1994. *Kindling induces time-dependent and regional specific changes in the [3H]muscimol binding in the rat hippocampus: a quantitative autoradiographic study.* Neuroscience, 59, 817-826

Toczek M.T., Carson R.E., Lang L., Ma Y., Der Spanaki M.V.M.G., Fazilat S., Kopylev L., Hrscoitch P., Eckelman W.C., Theodore W.H., 2003. *PET imaging of 5-HT_{1A} receptor binding in patients with temporal lobe epilepsy.* Neurology, 60, 749-756

Tuff L.P., Racine R.J., Mishra R.K., 1983. *The effects of kindling on GABA-mediated inhibition in the dentate gyrus in the rat II. Receptor binding.* Brain Research, 277, 91-98

Turkington T.G., 2001. *Introduction to PET instrumentation.* Journal of Nuclear Medicine Technology, 29, 4-11

U

Ueda Y., Tsuru N., 1995. Simultaneous monitoring of the seizure-related changes in extracellular glutamate and γ -aminobutyric acid concentration in bilateral hippocampi following development of amygdaloid kindling. Epilepsy Research, 20, 213-219

Uemura S., Kimura H., 1988. *Amygdaloid kindling with bicuculline methiodide in rats.* Experimental Neurology, 102, 346-353

Ullal G.R., Michalski B., Xu B., Racine R.J., Fahnestock M., 2007. *NT-3 modulates BDNF and proBDNF levels in naïve and kindled rat hippocampus.* Neurochemistry International, 50, 866-871

Uva L., Librizzi L., Wendling F., de Curtis M., 2005. *Propagation dynamics of epileptiform activity acutely induced by bicuculline in the hippocampal-parahippocampal region of the isolated Guinea pig brain.* Epilepsia, 46, 1914-1925

V

Van Bogaert P., De Tiege K., Vanderwinden J.M., Damhaut P., Schiffmann S.N., Goldman S., 2001. *Comparative study of hippocampal neuronal loss and in vivo binding of 5-HT_{1a} receptors in the KA model of limbic epilepsy in the rat.* Epilepsy Research, 47, 127-139

Velíšek L., 2006. Chapter 11 - Models of Chemically-Induced Acute Seizures. In: Models of Seizures and Epilepsy Vol., Asla Pitkänen., P.A. Schwartzkroin, S.L. Moshé, eds. Elsevier, Amsterdam

Velíšková J., 2006. Chapter 48 - Behavioral Characterization of Seizures in Rats In: Models of Seizures and Epilepsy Vol., Asla Pitkänen., P.A. Schwartzkroin, S.L. Moshé, eds. Elsevier, Amsterdam

Verel I., Visser G.W.M., van Dongen G.A., 2005. *The promise of immuno-PET in radioimmunotherapy.* Journal of Nuclear Medicine, 46, 164S-171S

Vezzani A., Serafini R., Samanin R., Foster A.C., 1990. *Autoradiographical analysis of excitatory amino acid binding sites in rat hippocampus during the development of hippocampal kindling.* Brain Research, 526, 113-121

W

Watanabe K., Minabe Y., Ashby C.R., Katsumori H., 1998. *Effect of acute administration of various 5-HT receptor agonists on focal hippocampal seizures in freely moving rats.* European Journal of Pharmacology, 350, 181-188

White H.S., 2002. *Animal models of epileptogenesis.* Neurology, 59 (Suppl. 5) 7-14

White H.S., 2003. *Preclinical development of antiepileptic drugs: past, present and future directions.* Epilepsia 44 (Supl.7); 2-8

Wiebe S., 2000. *Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy.* Canadian Journal of Neurological Sciences, 27, S6-S10

Wieland S., Goodale D., Lucki I., 1989. *Behavioral effects of 8-OH-DPAT: studies using the Microtaxis Ventricular Injector.* Journal of Neuroscience Methods, 30, 151-159

Willmann O., Wennberg R., May T., Woermann F.G., Pohlmann-Eden B., 2007. *The contribution of 18F-FDG PET in preoperative epilepsy surgery evaluation for patients with temporal lobe epilepsy. A meta-analysis.* Seizure, 16, 509-520

X

Xi W., Tian M., Zhang H., 2011. *Molecular imaging in neuroscience research with small-animal PET in rodents.* Neuroscience Research, 70, 133-143

Xu B. Michalski B., Racine R.J., Fahnstock M., 2004. *The effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) administration on kindling induction, Trk expression and seizure-related morphological changes.* Neuroscience, 126, 521-531

Y

Yakushev I.Y., Dupont E., Buchholz H.G., Tillmanns J., Debus F., Cumming P., Heimann A., Fellgiebel A., Luhmann H.J., Landvogt C., Werhahn K.J., Schreckenberger M., Potschka H., Bartenstein P., 2010. *In vivo imaging of dopamine receptors in a model of temporal lobe epilepsy.* Epilepsia, 51, 415-422

Yamada J., Sugimoto Y., Horisaka K., 1988. *The behavioural effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin(8-OH-DPAT) in mice.* European Journal of Pharmacology, 154, 299-304

Z

Zhang W.Q., Hudson P.M., Sobotka T.J., Hong J.S., Tilson H.A., 1991. *Extracellular concentrations of amino acid transmitters in ventral hippocampus during and after development of kindling.* Brain Research, 540, 315-318

Zhang G., Raol Y.S., Hsu F.C., Brooks-Kayal A.R., 2004. *Long-term alterations in glutamate receptor and transporter expression following early-life seizures are associated with increased seizure susceptibility.* Journal of Neurochemistry, 88, 91-101

Zhao D., Leung L.S., 1991. *Effects of hippocampal kindling on paired-pulse response in CA1 in vitro.* Brain Research, 564, 220-229

Zhou J., Cao X., Mar A.C., Ding Y.Q., Wang X., Li Q., Li L., 2013. *Activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors improve stress adaptation.* Psychopharmacology, epub

Zimmer L., Rbah L., Giacomelli F., Le Bars D., Renaud B., 2003. *A reduced extracellular serotonin level increases the 5-HT_{1A} PET ligand 18F-MPPF binding in the rat hippocampus.* The Journal of Nuclear Medicine, 44, 1495-1501